Untersuchungen des Mechanismus der Frostschädigung von Blättern frostempfindlicher und kälteakklimatisierter Blütenpflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Rupert J. Klosson
aus Düsseldorf

Juni 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Untersuchungen des Mechanismus der Frostschädigung von Blättern frostempfindlicher und kälteakklimatisierter Blütenpflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Rupert J. Klosson
aus Düsseldorf

Juni 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.H. Krause
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.A. Santarius
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1983

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	PFLANZENMATERIAL	16
3.	VERWENDETE CHEMIKALIEN	18
4.	METHODEN	21
4.1	Methoden für Messungen nach Frosteinwirkung in vivo	21
4.1.1	Kältebehandlung ganzer Blätter	21
4.1.2	Messungen an intakten und frostgeschädigten Blättern	23
4.1.2.1	Photosynthese und Atmung	23
4.1.2.2	Transpiration	25
4.1.2.3	Chlorophyll-a-Fluoreszenz	25
4.1.2.4	Apparente Absorption und Membranpotential-abhängiges Signal bei 535 nm	28
4.1.2.5	Chlorophyllbestimmung in Blattsegmenten	31
4.1.2.6	Bestimmung des ATP-Spiegels in Blättern	31

4.1.3	Biochemische und biophysikalische Messungen an isolierten Thylakoiden aus frostbehandelten Blättern	34
4.1.3.1	Isolierung der Thylakoide	34
4.1.3.2	Chlorophyll-Bestimmung in Thylakoid-Suspensionen	35
4.1.3.3	Nichtzyklischer Elektronentransport und Photophosphorylierung	35
4.1.3.4	Aktivitäten von Photosystem I und II	38
4.1.3.5	Chlorophyll-Fluoreszenz bei 77K	39
4.1.3.6	Lichtinduzierte H^+-Aufnahme und lichtinduzierter Protonengradient	40
4.2	Untersuchungen an isolierten Thylakoiden nach Frosteinwirkung in Vitro	43
4.2.1	Isolierung von Thylakoiden aus Spinatblättern	
4.2.1.1	Isolierung von Thylakoiden im NaCl-Medium nach SANTARIUS UND ERNST	43
4.2.1.2	Isolierung von Thylakoiden in einem Sorbitmedium	44
4.2.1.3	Kombination einer Isolierung von Thylakoiden in einem hypotonischen Medium mit einer Kältebehandlung	44
4.2.1.4	Isolierung von Thylakoiden in Preßsaft aus Spinatblättern	45
4.2.1.5	Isolierung von Thylakoiden nach Blattaufschluß mit Seesand im Mörser	45

4.2.2	Untersuchungen zur Rolle der Vakuoleninhaltsstoffe bei der Frostschädigung	46
4.2.2.1	Gewinnung eines Preß-Saftes aus Blättern von *Spinacia oleracea L.* und *Viola x wittrockiana Gams*	46
4.2.2.2	Bestimmung von Zucker- und Proteingehalt der erhaltenen Preß-Saft- Präparationen	47
4.2.2.3	Einfluß des Preß-Saftes aus Spinat- und Viola-Blättern auf Spinat-Thylakoide bei +20 C	49
4.2.2.4	Einfluß des Preß-Saftes aus Spinatblättern auf Spinat-Thylakoide bei 0 C	50
4.2.2.5	Einfluß des Preß-Saftes aus Spinatblättern auf Spinat-Thylakoide beim Frieren und Auftauen	50
4.2.2.6	Frost-Inaktivierung von Spinat-Thylakoiden durch NaCl in Gegenwart von Preß-Saft aus Spinatblättern	51
4.2.3	Frieren und Auftauen von Thylakoiden in Gegenwart von Schutz- und Schadstoffen	52
4.2.3.1	Saccharose und Salzionen	52
4.2.3.2	Saccharose und Caprylat, Phenylalanin oder Phenylpyruvat	52
4.2.4	Untersuchungen an kältebehandelten Thylakoiden aus besonderen Isolierungsverfahren	53

5.	ERGEBNISSE	54
5.1	Frostschädigung von Spinatblättern	54
5.1.2	Transpiration in Abhängigkeit vom Ausmaß der Frostschädigung	57
5.1.3	Einfluß der Frostbehandlung auf den nichtzyklischen Elektronentransport, die Photophosphorylierung und die Pigmentsysteme der Photosynthese	59
5.1.4	Einfluß der Frostbehandlung auf die lichtinduzierte H^+-Aufnahme und den lichtinduzierten Protonengradienten	64
5.1.5	ATP-Spiegel in frostbehandelten Spinatblätter	67
5.1.6	Frostschädigung von Spinatblättern in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Frierens und Auftauens sowie der Verweildauer bei tiefen Temperaturen	69
5.1.7	Schädigung der Thylakoide durch das Auftauen der Blätter	73
5.2	Untersuchungen zur Erholung frostgeschädigter Spinatpflanzen	76
5.3.	Frostschädigung von ausgewählten C3-Pflanzen im Vergleich zu *Spinacia oleracea L.*	81
5.3.1	Untersuchungen an krautigen Pflanzen: *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze, Viola x wittrockiana Gams, Triticum aestivum L.*	81
5.3.2	Untersuchungen an einer immergrünen, holzigen Planze: *Hedera helix L.*	94

5.3.3 Vergleich der Frostschädigung und Frosthärtung von *Spinacia oleracea L.*, *Tetragonia tetragonioides (Pall) O.Kunze*, *Viola x wittrockiana Gams*, *Triticum aestivum L. und Hedera helix L.* 97

5.4. Frostschädigung von isolierten Thylakoiden in Gegenwart von Salzionen 102

5.3.1 Wirkung von NaCl 103

5.4.2 Wirkung von $MgCl_2$ 106

5.5 Einfluß des Preßsaftes aus *Spinat*-und *Viola*-Blättern auf photosynthetische Reaktionen von Thylakoiden 109

5.5.1 Zucker-und Eiweißgehalt des Preß-Saftes von ungehärteten und gehärteten Blättern von *Spinacia oleracea L.* und *Viola x wittrockiana Gams* 109

5.5.2 Inaktivierung photosynthetischer Reaktionen von Spinatthylakoiden durch Preßsaft aus Spinat- und Violablättern bei +20 C. 112

5.5.3 Einfluß des Preßsaftes aus Spinatblättern bei 0 C auf photosynthetische Reaktionen von Spinatthylakoiden 117

5.5.4 Einfluß des Preßsaftes aus Spinatblättern auf photosynthetische Reaktionen von Spinatthylakoiden während des Frierens 128

5.6 Frostschädigung isolierter Thylakoide durch Frieren in Gegenwart organischer Schadstoffe 138

6. DISSKUSSION 144

6.1 Mögliche Ursachen der Inaktivierung der Photosynthese nach der Frostbehandlung von Blättern 144

6.2 Die Bedeutung von Zellinhaltsstoffen für die Inaktivierung der Thylakoidmembran 153

6.3 Hinweise auf eine Beteiligung physikalischer Effekte an der Frostschädigung von Pflanzen 165

6.4 Einfluß der Frosthärtung der Blätter auf die Frostempfindlichkeit der Thylakoide 171

6.5 Frostschädigung von ganzen Blättern in Abhängigkeit von ihrem Härtungsgrad 172

6.6 Möglichkeiten frostgeschädigter Pflanzen zur Erholung 173

6.7 Schlußfolgerungen zum Mechanismus der Frostschädigung in vivo 175

7. ZUSAMMENFASSUNG 177

8. LITERATURVERZEICHNIS 180

1 Einleitung

Frieren und Tauen der Blätter führt bei den meisten Pflanzen zu schweren Zellschädigungen und damit zum Absterben des Gewebes. Eine Reihe überwinternder krautiger oder immergrüner Pflanzen der gemäßigten Klimazonen sind in der Lage, durch Anpassung an niedrige Temperaturen unter Kurztagbedingungen eine begrenzte Frosttoleranz der Blätter zu erwerben.

Gehärtete Blätter sind in der Lage, Frost innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs ohne Schaden zu überstehen. Dabei zeigen sich aber je nach Art erhebliche Unterschiede im Ausmaß der Härtung, die erreicht werden kann. Unterschreitet die Umgebungstemperatur die Toleranzgrenze, so kommt es bei Frost zur Schädigung der Blätter. Erste Zeichen dieser Schädigung sind eine Infiltration der Blätter und ein Turgorverlust der Zellen. Über die möglichen Ursachen des Zelltodes beim Frieren liegen in der Literatur unterschiedliche Theorien vor.

Die meisten Autoren sehen die Hauptursache der Frostschädigung in einer Änderung der Struktur von Membransystemem (Lyons et al., 1979). Isolierte Thylakoide (Heber et al., 1979a) und Mitochondrien (Thebud und Santarius, 1981b) werden durch Frieren und Tauen je nach den experimentellen Bedingungen geschädigt. Nach Santarius und Giersch (1983) ist das Ausmaß der Membraninaktivierung in vitro abhängig von der Zusammensetzung des Mediums, von der Friertemperatur, der Dauer des Frierens und von den Frier-und Auftaubedingungen.

Eine mechanische Schädigung durch Eiskristalle wird bei intrazellulärer Eisbildung beobachtet, diese tritt aber nur bei sehr raschem Frieren in flüssigem Stickstoff ein (SIMINOVITCH,1981). Die Eisbildung in der Zelle wird daher von fast allen Autoren als direkte Ursache der Frostschädigung in vivo verworfen. Beim langsamen Frieren erfolgt die Eisbildung außerhalb der Zellen. Hier wird eine Schädigung der Zellen durch Dehydratation des Protoplasma oder der Membranen angenommen (SIMINOVITCH,1981). WILLIAMS UND MERYMAN (1970) vermuten, daß auch die Volumenreduktion der Thylakoidmembranen durch Entfernen des Wassers während des Frierens für die Membranschädigung verantwortlich sein kann. Dabei soll der Frierschaden dann eintreten, wenn das Thylakoidvolumen durch das osmotische Schrumpfen unter eine minimale Toleranzgröße reduziert worden ist (MERYMAN, 1971A UND B, TOWILL UND MAZUR, 1976). Nach LARCHER (1981B) müssen diese Schrumpfungsvorgänge insbesondere im Gewebsverband zu einer starken Zunahme der Wandspannung und damit zu einer starken Belastung der Zellmembran führen.

Möglich ist, daß durch die Dehydratation während des Frierens die Balance zwischen den stabilisierenden Kräften der Lipidkomponenten der Membran gestört wird, und es zu Umordnungen im Lipidteil der Membranen kommt (MORRIS UND MC GRATH, 1981). Dadurch kann eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Membranen eintreten (HEBER, 1968). Auch eine direkte Interaktion zwischen anorganischen Salzen und den geladenen Oberflächen der Membranen oder zwischen amphiphilen Substanzen und der Lipid-Doppelschicht bzw. integrierten Membranproteinen wird für möglich gehalten (HEBER ET AL., 1979A). Denkbar ist auch eine Ablösung von Membranproteinen, wodurch "Leckstellen" entstehen würden. Ein Verlust der Semipermeabilitätseigenschaften der Membranen im Gefolge der Frosteinwirkung wird auch bei LOVELOCK (1953A) und MERYMAN (1968) diskutiert.

Eingehende Untersuchungen gibt es besonders zur Frostschädigung der Thylakoide. Nach frühen Untersuchungen von HEBER UND SANTARIUS (1964) stellt die Hemmung der Photophosphorylierung die Primärschädigung von Thylakoiden nach dem Frieren in vitro dar. In Gegenwart von Salzionen wird zunächst die Phosphorylierung irreversibel vom Elektronentransport entkoppelt. Unter sehr starker Kälteeinwirkung oder sehr hohen Salzkonzentrationen kommt es zusätzlich zu einer Inaktivierung des Elektronentransports. (HEBER UND ERNST, 1967; HEBER, 1967 UND 1968; HEBER ET AL.,1973; SANTARIUS, 1968 UND 1973A; SANTARIUS UND HEBER, 1967). Die Photophosphorylierung ist ein Prozeß, der ein geschlossenes Membransystem mit spezifischen Permeabilitätseigenschaften fordert. Die höhere Empfindlichkeit der Phosphorylierung mag sich hieraus erklären.

Durch den Verlust der Fähigkeit zur ATP-Synthese läßt sich der Zelltod leicht als Folge eines Zusammenbruchs des Zellstoffwechsels erklären. Der Zusammenbruch der Photophosphorylierung ist nach HEBER (1967, 1968) und JENSEN (1981) Folge einer verstärkten Protonendurchlässigkeit der Membran, so daß der lichtinduzierte Protonengradient als treibende Kraft für die Phosphorylierung nicht mehr aufgebaut werden kann (s.a. chemiosmotische Theorie von MITCHELL, 1966). Der Elektronentransport und die Photophosphorylierung sind dann voneinander entkoppelt. Dabei reichen bereits geringfügige Veränderungen in der Membran für eine Entkopplung aus.

Auf Grund des vergrößerten Volumens von frostgeschädigten Thylakoiden vermutet JENSEN (1981), daß während des Frierens die Permeabilität auch für andere Substanzen als Protonen erhöht wird. GUSTA ET AL. (1982) sprechen sogar von einem kompletten Verlust der kontrollierten Membran-Permeabilität. Andere Autoren schränken den Verlust der Fähigkeit der Membran zum kontrollierten

Transport auf wenige Ionen (insbesondere K^+) ein, während die übrigen Semipermeabilitätseigenschaften erhalten bleiben sollen (PALTA UND LI, 1980).

Durch die beim Frieren eintretende Entwässerung der Zellen können bestimmte Zellinhaltsstoffe zu Konzentrationen gelangen, die auf Membranen toxisch wirken (HEBER, 1967). Es gibt verschiedene Typen dieser "kryotoxischen" Substanzen (anorganische Salze, Salze bestimmter organischer Säuren und Aminosäuren, Fettsäuren), die die Thylakoidmembran in vitro zu schädigen vermögen, wenn ihre Konzentrationen während des Frierens infolge der Eisbildung ansteigen und Schutzstoffe nicht in ausreichender Konzentration anwesend sind. Dies wurde in zahlreichen Arbeiten (SANTARIUS UND HEBER, 1970; SANTARIUS, 1969 UND 1971A; TYANKOVA, 1970; HEBER ET AL., 1979A; JENSEN, 1981) gezeigt. Am besten untersucht ist dabei der kryotoxische Einfluß anorganischer Salze, deren Membrantoxizität mit der Wirkung vergleichbar ist, die HOFMEISTER (1888) für die Denaturierung der Proteine beschrieben hat. Dies führte zu der Vermutung, daß das Frieren vor allem einen Einfluß auf die Membranproteine ausübt.

Die Inaktivierung der Membran ist abhängig von der Natur und Konzentration der Lösungskomponenten sowie der Länge der Expositionszeit (SANTARIUS, 1971A; SANTARIUS UND HEBER, 1970; HEBER ET AL., 1971 UND 1973). Amphiphile organische Substanzen wie z.B. Phenylpyruvat zeigen eine andere Schadwirkung als anorganische Salze. Zwar bedingen sie ebenfalls Entkopplungseffekte, bewirken aber zusätzlich eine starke Hemmung des Elektronentransports.

Die Untersuchungen von SANTARIUS (1973A) zeigen, daß neben der überwiegend chemischen Interaktion von Schadstoffen mit der Membran auch rein physikalische Vorgänge beim Frieren eine Membraninaktivierung verursachen können. So kommt es beim Erreichen der Temperatur der eutektischen Kristallisation immer zum Zusammenbruch der Photophosphorylierung - unabhängig davon, ob in der Thylakoidsuspension Schad- oder Schutzstoffe vorhanden sind. Im Gegensatz zu den oben erwähnten In-Vitro-Experimenten führen Salze bei eutektischen Kristallisationen auch zur Hemmung des Elektronentransports. In vivo sind eutektische Phänomene aber noch nicht beobachtet worden (LEVITT, 1966).

Während die membrangebundenen Reaktionssysteme durch Frost drastisch geschädigt werden, finden sich in der Literatur nur wenige Hinweise auf eine Denaturierung löslicher Chloroplasten-Enzyme unter Frosteinwirkung. Enzyme, die aus Zellen bzw. Thylakoiden isoliert und gereinigt werden, zeigen in vitro einen Aktivitätsverlust nur in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Im Zellmilieu (auch in ungehärteten Zellen) scheinen Enzyme dagegen durch Cofaktoren, Substrate und neutrale Komponenten vor einer Denaturierung während des Frierens geschützt zu werden (HEBER, 1968). Dies deckt sich auch mit der Beobachtung, daß Enzyme bei niedrigeren Temperaturen meist stabiler sind als bei höheren. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß nach Fortfall der Kompartimentierung die Milieubedingungen im Blatt so verändert sind, daß die Enzyme nach dem Frieren und Tauen in einem inaktivierten Zustand vorliegen.

Im Gegensatz zu den löslichen Enzymen konnte für membrangebundene Enzym-Komplexe eine Frostinteraktion nachgewiesen werden: VOLGER ET AL. (1978) sowie GARBER UND STEPONKUS (1976A) zeigten, daß beim Frieren unter

bestimmten Bedingungen Proteine von der Membran abgelöst werden, darunter u.a. die $NADP^+$-Reduktase, das Plastocyanin und der Kopplungsfaktor CF_1 bzw. Untereinheiten von CF_1. Die Ablösung des CF_1 kann den Zusammenbruch des ΔpH erklären, weil der H^+-Kanal (CF_0) in der Membran zurückbleibt. Allerdings ist umstritten, ob die Dissoziation des Kopplungsfaktors die Inaktivierung der Photophosphorylierung erklären kann, da die Entkopplung bereits eintreten kann, wenn noch kein meßbarer Anteil des CF_1 von der Membran dissoziiert ist. Der Ablösung könnte aber eine experimentell nicht meßbarere Lockerung des Kopplungsfaktors vorausgehen, die bereits zum Verlust der Funktion führt.

Auch die Lipidphase der Membranen ist als möglicher Ort der Primärschädigung eingehend untersucht worden. CRITCHLEY (1976) schließt eine Änderung der strukturellen Anordnung der Membranlipide als Ursache der Frostschädigung aus. Dagegen deutet CRITCHLEY an, daß beim Frieren von Blättern in vivo die Membranen durch freie Fettsäuren geschädigt werden könnten, die bei einem frostinduzierten Abbau von Membranlipiden entstehen. Ebenso berichten MORRIS UND MC GRATH (1981), daß während der frostinduzierten Dehydratation Lipide aus der Membran freigesetzt werden. Durch ULLRICH UND HEBER (1961) ist bekannt, daß verschiedene Lipide hemmend auf die Hill-Reaktion und die Photophosphorylierung wirken. Diese Membranschädigung wäre aber nur ein sekundärer Frostschaden, der die Frage nach dem Primärschaden und seinen Ursachen offen ließe. Nach JENSEN (1981) ist mit Ausnahme der Öffnung der Protonenkanäle die Organisation der geschädigten Membran weitgehend unverändert. Weder finden sich frostinduzierte Änderungen von ESR-Fluiditätsparametern, noch können globale Mikrostrukturveränderungen im Lipidbereich nachgewiesen werden. Dagegen gibt es Hinweise auf eine Umlagerung von Membranproteinen (YOSHIDA UND SAKAI, 1974; PALTA UND LI, 1980)

Die In-Vivo-Schädigung der Thylakoide weicht von dem Ablauf der Frostschädigung in vitro ab und erscheint sehr komplex. KLOSSON UND KRAUSE (1981A,B: DIPLOMARBEIT 1978) fanden für Thylakoide aus kältebehandelten Spinatblättern, daß verschiedene gemessene photosynthetische Reaktionen (Elektronentransport, Photophosphorylierung, Kopplung) nahezu parallel zusammenbrechen. Mit der Hemmung der CO_2-Assimilation korreliert sehr gut die makroskopisch sichtbare Frostschädigung der Blätter: Eine Infiltration der Blätter als Zeichen des Verlustes der Semipermeabilität von Plasmalemma und Tonoplast. Allerdings lassen die vorhergehenden Untersuchungen vermuten, daß die photosynthetische CO_2-Fixierung von Blättern im Vergleich zu den photosynthetischen Reaktionen der Thylakoide sensibler ist. Auch innerhalb der Einzelreaktionen des Elektronentransports scheint es Unterschiede in der Frostempfindlichkeit zu geben. HEBER ET AL. (1973) sowie KLOSSON (1978) vermuten aus ihren In-Vivo-Experimenten, daß innerhalb des Elektronen-Transportsystems der Wasserspaltungsapparat empfindlicher als die beiden Photosysteme ist.

Die an den Thylakoiden nach der Frostschädigung in situ nachgewiesenen Veränderungen der Aktivität photosynthetischer Reaktionen werden durch die Änderungen der physikalischen Signale (Chlorophyll-a-Fluoreszenz, apparente Absorption und Membranpotential-abhängiges Signal bei 535 nm) bei Spinatblättern nach der Kältebehandlung bestätigt. Diese Signale gelten als Indikatoren des lichtabhängigen Protonengradienten über die Thylakoidmembran und der Thylakoidenergetisierung (KLOSSON UND KRAUSE, 1981B: KLOSSON, 1978). Auch ist die frostbedingte Inaktivierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung häufig stärker ausgeprägt als die Veränderungen der biophysikalischen Signale.

MAZUR (1969) vermutete bereits, daß durch das Frieren der Zellen nicht nur die Permeabilität der Membranen von Chloroplasten und Mitochondrien verändert wird, sondern daß auch andere Membransysteme durch Frost geschädigt werden. SENSER UND BECK (1977, 1979) nehmen an, daß in vivo die Schädigung nicht nur durch die Dehydratation der Zellen, sondern zusätzlich durch die Freisetzung lytischer Enzyme oder toxischer Substanzen erfolgt, nachdem die kompartimentierenden Membranen ihre selektiven Permeabilitätseigenschaften verloren haben. Dabei gelten Tonoplast und Plasmalemma als die empfindlichsten Membranen (ZIEGLER UND KANDLER, 1980; WIEST UND STEPONKUS, 1978).

Die meisten Untersuchungen der Frostschädigung von Biomembranen fanden bisher an Thylakoiden statt. Mitochondrien waren in vitro etwas weniger frostempfindlich als Thylakoide unter vergleichbaren Bedingungen. Dieser Unterschied verschwindet aber, wenn Thylakoide und Mitochondrien aus kältebehandelten Blättern untersucht werden (THEBUD UND SANTARIUS, 1981A). Parallel zur Schädigung von Thylakoiden und Mitochondrien erfolgt auch eine Schädigung der Chloroplasten-Hüllmembran durch Frost (KLOSSON, 1978). Es sieht so aus, als ob durch den Frost alle Membransysteme betroffen werden. Einige Autoren postulieren allerdings für den Tonoplasten und das Plasmalemma eine erhöhte Frostempfindlichkeit (SENSER UND BECK, 1977; WIEST UND STEPONKUS, 1978: s.a. Diskussion).

Gegen Frostschäden kann sich die Zelle im begrenzten Maße schützen. Nach YOSHIDA UND SAKAI (1974) ist der Erwerb der Frostresistenz mit Änderungen in der Zusammensetzung der Biomembranen verbunden. Insbesondere die Phospholipidmenge steigt in den Zellen während der Adaptation an. Andere Autoren wie SIMINOVITCH ET AL. (1968) und DE LA ROCHE (1973A) finden an anderen

Objekten keinen bevorzugten Anstieg der Phospholipidmenge, sondern einen gleichmäßigen Anstieg aller Membranlipide.

Eine Anreicherung ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden während der Härtung soll die Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen sichern (HILDITCH ET AL. 1964; REDSHAW ET AL. 1968; DE LA ROCHE. 1973B). Es gibt aber auch Untersuchungen, in denen es zu einer Härtung ohne einen entsprechenden Anstieg des Anteils ungesättigter Fettsäuren kommt (YOSHIDA UND SAKAI. 1974). SIMINOVITCH ET AL. (1975) ziehen aus diesen Ergebnissen den Schluß, daß die Frosthärtung mit einen Syntheseanstieg aller Membrankomponenten verbunden ist, die bei einigen Pflanzen beobachtete Zunahme des Phospholipidanteils und der ungesättigten Fettsäuren aber in keinem direkten Zusammenhang mit der Frosthärtung stehen sollen.

JENSEN (1981) fand keine signifikanten Unterschiede in den ESR-Parametern zwischen gehärtetem und ungehärtetem Material von Spinat und Wintergerste. CRITCHLEY (1976) fand bei Grünkohl keinen Zusammenhang zwischen der Lipidzusammensetzung der Membranen und dem Erwerb der Frostresistenz. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von SANTARIUS (1971B), der beim Vergleich von Thylakoiden aus frostempfindlichen und frostresistenten Spinatblättern keinen Unterschied in der Empfindlichkeit beim Frieren in vitro feststellen konnte. Die Frosthärtung wird hier auf eine Änderung der Membranumgebung (Anhäufung von Zuckern, Proteinen) zurückgeführt.

In vitro lassen sich Thylakoide durch niedermolekulare Zucker, Zuckerderivate sowie Salze organischer Säuren vor der Frostschädigung schützen (JAGENDORF UND AVRON. 1958; DUANE UND KROGMAN. 1973; SEYBOLD. 1969;

JEREMIAS, 1969; HEBER UND SANTARIUS, 1964; HEBER ET AL., 1979A; SANTARIUS, 1971A; SANTARIUS ET AL., 1979). Die Schutzwirkung der Zucker hängt dabei sowohl von der Konzentration wie von der Molekülgröße der Zucker ab (SANTARIUS, 1973B; SANTARIUS UND GIERSCH, 1983).

Dagegen sehen STEPONKUS ET AL. (1977) den Hauptmechanismus der Frosthärtung beim Spinat in einer Veränderung der Struktur der Thylakoidmembran, die eine Ablösung des CF_1-Faktors der membranständigen ATP'ase erschwert. GARBER UND STEPONKUS (1976B) berichten, daß aus frostharten Spinatblättern isolierte Thylakoide weniger frostsensibel sind als Thylakoide aus ungehärteten Spinatblättern. Auch die mikroskopische Feinstruktur der Chloroplasten ändert sich danach während der Härtung. Auffällig ist, daß sich das Volumen der Chloroplasten während der Härtung verändern kann (HEBER,1958).

Eine Erklärung für die z.T. sehr widersprüchlichen Ergebnisse kann die Annahme sein, daß die Frosthärtung bei verschiedenen Arten und Rassen nach verschiedenen Mustern abläuft (SANTARIUS, 1978). Nach SIMINOVITCH (S. SIMINOVITCH ET AL.,1975; SIMINOVITCH, 1981)besteht z.B. ein wesentlicher Unterschied im Erwerb der Frostresistenz zwischen krautigen Pflanzen und Holzpflanzen. Während bei Kräutern die Härtung überwiegend von der sinkenden Temperatur gesteuert wird, spielt bei der Härtung der Bäume die Umgebungstemperatur eine geringere Rolle. Hier ist die Jahreszeit und der von ihr abhängige Lichtrhythmus entscheidend. Auch KANDLER ET AL. (1979) sowie SENSER UND BECK (1979) berichten, daß bei der Fichte eine Kombination von Kurztag und niedriger Temperatur zur Härtung erforderlich ist. Dabei kommt dem Kurztag der entscheidendere Anteil an der Induktion der Härtung zu. Die Fähigkeit zum Erwerb der Frostresistenz ist nach SIMINOVITCH (1981)bei Bäumen genetisch fixiert.

LEVITT (1956) konnte zeigen, daß der Gesamtzuckergehalt von Zellen frostresistenter Pflanzen tatsächlich häufig erhöht ist. Schutzstoffe können aber nur dann wirksam werden, wenn sie sich in unmittelbarer Umgebung der schützenden Membranen befinden. Sogar geringe Mengen an Schutzstoffen in der Zelle können einen guten Schutz bieten, wenn sich durch eine stark ungleiche Verteilung der Schutzstoffe hohe Schutzstoffkonzentrationen in der Umgebung der zu schützenden Strukturen befinden. Diese Überlegung erklärt auch, weshalb einige Pflanzen wie z.B. das Zuckerrohr trotz ihres hohen Zuckergehalts keine, "zuckerarme" Moose aber eine hohe Frostresistenz erwerben können (SCARTH UND LEVITT, 1937). Durch Verschiebung von Schutzstoffen zwischen den Kompartimenten wäre sogar eine Frosthärtung ohne Neusynthese von Schutzstoffen denkbar.

Diese These konnte durch den Nachweis des Anstiegs der Zuckerkonzentrationen in den Spinatblättern während der Frosthärtung und besonders in der Umgebung zu schützender Strukturen erhärtet werden (SANTARIUS UND MILDE, 1977; HEBER, 1957 UND 1959B; KAPPEN UND ULLRICH, 1970; TRÖSTER, 1982; KRAUSE ET AL., 1981B). So steigt in Chloroplasten aus Grünkohlblättern die Konzentration der Zucker (insbesondere von Saccharose, aber auch von Glukose und Fruktose) während der Härtung stärker an als im Cytoplasma. Zusätzlich treten auch Zucker wie die Raffinose auf, die im Sommer in den Pflanzen nicht zu finden sind (JEREMIAS, 1962; KANDLER ET AL., 1979). KÖPPEN (1979) gibt an, daß mit 134 mMol/l in den Chloroplasten während der Härtung eine Zuckerkonzentration erreicht wird, die in vitro nahezu vollen Schutz gewährleistet. Zusätzliche Studien von JUSTENHOVEN (1982) zeigen auch eine Akkumulation kryoprotektiver Aminosäuren in den Chloroplasten im Laufe der Härtung.

Die Schutzwirkung der Zucker und vieler anderer Stoffe beruht auf zwei Mechanismen: Zum einen auf dem kolligativen Prinzip; die Schutzstoffe vermindern beim Gefrieren den Konzentrationsanstieg der kryotoxischen Substanzen in der Nähe der Membranen. Zum anderen können Schutzstoffe aber auch direkt in Wechselwirkung mit der Membran treten. So wäre denkbar, daß die Hydroxylgruppen der Schutzstoffe die membranstabilisierende Wirkung des Wassers ersetzen können. Auch die Widerstandsfähigkeit der Membranen könnte durch das Eindringen protektiver Substanzen in die Membranstruktur gesteigert werden. (Zusammenfassung bei SANTARIUS, 1971B; SANTARIUS, 1973B; HEBER, 1968; HEBER UND SANTARIUS, 1973). Andere Autoren sehen in der Frostresistenz den Erwerb der Fähigkeit durch die Zelle, ein zu starkes Schrumpfen unter der Frosteinwirkung zu vermeiden. Dies soll u.a. durch die kolligativ wirkenden Schutzstoffe gewährleistet werden (MERYMAN, 1971A UND B); deren Akkumulation erhöht den osmotischen Wert und vermindert damit den Wasserentzug.

Der Mechanismus des Frostschutzes wird aber noch dadurch kompliziert, daß viele Schutzstoffe (bestimmte organische Säuren und Aminosäuren) in höheren Konzentrationen oder bei Abwesenheit anderer kryoprotektiver oder kryotoxischer Substanzen schädigend wirken können (SANTARIUS, 1971A; SANTARIUS ET AL., 1979). Umgekehrt kann durch Kombination zweier Schadstoffe ein Frostschutz erreicht werden, wenn beide verschiedene Angriffspunkte an der Membran haben. Frostschutz scheint daher nicht das Ergebnis der Wirkung eines einzelnen Schutzstoffes zu sein, sondern auf der Wirkung einer ausgewogenen Kombination von zahlreichen Komponenten zu beruhen.

Neben den niedermolekularen Schutzstoffen wurden auch frostschützende Proteine gefunden. SIMINOVITCH ET AL. (1967) und KANDLER ET AL. (1979) berichten über eine Zunahme der wasserlöslichen Proteine während der Härtung, HEBER UND ERNST (1967) konnten spezifische kryoprotektive Proteine nachweisen (HEBER, 1970; HEBER UND KEMPFLE, 1970). Diese Schutzproteine sind auf molekularer Basis ca 1000 bis 2500fach wirksamer als Saccharose (s. HEBER, 1968; SANTARIUS, 1971b). Ihre Wirkungsweise muß daher anderer Natur als die der Zucker sein. Nach WEIDNER UND HEUEL (1979) sind lösliche Proteine aus frostadaptierten Pflanzen widerstandsfähiger gegen konzentrierte Elektrolytlösungen. Da die Änderung dieser Fähigkeit während der Härtung und Enthärtung relativ rasch erfolgt, wird an eine temperaturkontrollierte intramolekulare Umlagerung von Proteinen gedacht. Es werden aber auch neue Proteine synthetisiert, bei denen es sich um die Frostschutzproteine von HEBER UND KEMPLE (1970) handeln könnte. VOLGER (1974) wies nach, daß der Gehalt an Schutzproteinen in Blättern vom Härtungsgrad abhängig ist.

Die Reversibilität von Frostschäden in vivo ist bisher erst wenig erforscht. So schreibt LARCHER (1969), daß die Einzelpflanze sich um so eher erholt, je geringer der Anteil des geschädigten Gewebes ist. Untersuchungen von BAUER ET AL. (1969) an Tannen zeigen, daß nach Depression der Photosynthese durch Frost (und Eisbildung in den Tannennadeln) nach einigen Tagen wieder eine Erholung erfolgt. Diese dauert um so länger, je tiefer die Temperatur des Abkühlprogramms ist. Allerdings sind in diesen Experimenten durch die Frosteinwirkung nur ca 20% des Assimilationsgewebes geschädigt worden. Im Gefolge des Kälteschocks kommt es mit der Depression der Photosynthese nach dem Auftauen zu einem vorübergehenden Anstieg der Dunkelatmung.

PALTA UND LI (1980) berichten, daß sogar frostgeschädigte Pflanzenzellen, die nach Schädigung Zucker und K^+-Ionen verlieren, noch zur Erholung fähig sein können. Die Verluste sollen in einer Reparaturphase wieder ausgeglichen werden.

Das Ausmaß der Atmungssteigerung ist bei frostharten Pflanzen niedriger als bei ungehärteten Pflanzen. Nach LARCHER (1983) soll es durch die Entwässerung des Protoplasmas während des Frierens in diesen Fällen zu reparablen, aber nicht sofort reversiblen molekularen und feinstrukturellen Veränderungen in den Chloroplasten kommen. Die gesteigerte Atmungsaktivität wird als Zeichen eines Reparaturvorgangs gedeutet. Nach SENSER UND BECK (1979) kommt es auch bei der Fichte nach dem Auftauen zu einer Stimulation der Atmung.

Bei einem trockenresistenten Moos wurde von MALEK UND BEWLEY (1978) ebenfalls nur eine reversible Veränderung des Metabolismus durch langsames Frieren und Tauen beobachtet. Dagegen stellte KLOSSON (DIPLOMARBEIT, 1978) bei frostgeschädigten Spinatblättern fest, daß unabhängig vom Ausmaß der Schädigung eine Erholung nicht möglich ist. Die Schädigung schreitet vielmehr bei Aufbewahrung der Blätter bei Zimmertemperatur nach dem Auftauen weiter fort. Es zeigen sich hierbei auch keine Unterschiede zwischen jungen und alten Blättern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, eine detaillierte Aufklärung der Vorgänge bei der Frostschädigung in vivo. Der erste Teil befaßt sich mit der Frage, welcher Parameter der Photosynthese durch die Frosteinwirkung primär betroffen wird. Bereits in früheren Untersuchungen war die Vermutung geäußert worden, daß die CO_2-Fixierung geringfügig frostempfindlicher sein könnte als die übrigen photosynthetischen Parameter.

Im zweiten Teil der Arbeit interessiert die Frage, ob die bisher am Spinatmodell erarbeiteten Mechanismen der Frostschädigung und Frosthärtung auch auf andere Pflanzen übertragbar sind. Hierzu wurden verschiedene Arten krautiger Pflanzen im gehärteten und nicht gehärteten Zustand sowie eine kälteakklimatisierte immergrüne holzige Pflanze untersucht.

Im dritten Teil der Arbeit wird die kryotoxische Wirkung diverser Substanzen charakterisiert, die für die Frostschädigung der Thylakoide in vivo verantwortlich sein könnten. Es wird der Einfluß von Schadstoffen mit Modellcharakter auf Thylakoide in in-vitro-Experimenten dargestellt und mit den Vorgängen in vivo verglichen. In diesem Zusammenhang wurde auch die Frage erneut aufgegriffen, ob Thylakoide aus gehärteten Blättern weniger stark durch die Einwirkung kryotoxischer Stoffe während des Frierens und Tauen geschädigt werden als Thylakoide aus nicht gehärteten Blättern, d.h. ob die Thylakoide selbst eine erhöhte Härte erwerben können. Um die These zu überprüfen, ob die Schädigung der Thylakoide in vivo durch Schadstoffe aus der Vakuole erfolgt, wurde in einer ausgedehnten Versuchsreihe die Wirkung von Zellsäften aus gehärteten und ungehärteten Blättern auf Thylakoide in vitro untersucht.

2. Pflanzenmaterial

Als Versuchspflanzen dienten *Spinacia oleracea L.* (Spinat, Kultursorte *"Monatol"*), *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze* (Neuseeland-Spinat), *Hedera helix L.* (Efeu), *Viola x wittrockiana Gams* (Stiefmütterchen, Kultursorte *"Aalsmeer Riesen"*), und *Triticum aestivum L.*(Weizen, Kultursorten *"Carimulti"* und *"Disponent"*).

Blätter von *Hedera* wurden im Winter (Nachtfröste um -10 C) von im Freiland stehenden Pflanzen gepflückt, *Spinacia*, *Tetragonia*, *Triticum* und *Viola* im Gewächshaus auf Erde angezogen.

Spinacia: Vier Wochen alte Pflanzen wurden für eine Woche in einer Klimakammer "Großraumanlage für biologische Untersuchungen" der Firma Voetsch/Balingen kultiviert. Die Temperatur in der Klimakammer betrug tagsüber +20 C und nachts +15 C, die Luftfeuchtigkeit 75%. Als Photoperiode (Tageslänge) wurden zehn Stunden gewählt, bei einer Lichtintensität von 25.000 Lux.

Ein Teil der Pflanzen kam danach als ungehärtetes Material sofort zur Verwendung, während die übrigen Pflanzen einen Härtungsprogramm unter standardisierten Kurztagebedingungen modifiziert nach Critchley (1976) in einem Klimaschrank der Firma Weiss/Giessen unterworfen wurden. Bei 75% Luftfeuchtigkeit und einer Photoperiode von täglich acht Stunden (25.000 Lux) wurden die Tages- und Nachttemperaturen stufenweise wie folgt verändert:

	Temperatur (C)	
	Photoperiode	Dunkelperiode
1./2. Tag	15	10
3./4. Tag	10	3
5./6. Tag	10	1
7./8. Tag	1	1

Tetragonia/Viola/Triticum: Von *Tetragonia* und *Triticum* wurden Pflanzen im Alter von ca. vier bis sechs Wochen, von *Viola* im Alter von acht bis zehn Wochen verwendet. Das ungehärtete Material wurde wie bei *Spinacia* behandelt, die Frosthärtung erfolgte wie folgt: *Triticum* und *Viola* wurden in den Wintermonaten (Nachtfröste) für vier Wochen ins Freiland gestellt, *Tetragonia* für vier Wochen in einem ungeheizten Gewächshaus bei ca. +10 C tags und ca. +3 C nachts in den Monaten November bis Februar aufbewahrt. Anschließend wurden diese Pflanzen als gehärtetes Material verwendet.

Es wurde eine Erhöhung der Frostresistenz um ca. 1 C bei *Tetragonia*, 5-6 C bei *Spinacia*, 10 C bei *Triticum* und ca. 15 C bei *Viola* beobachtet. Als Maß für die Frosthärte wurde die Temperatur der Kältebehandlung (s. 4.1.1) bestimmt, bei der die Photosyntheseleistung der Blätter nach dem Frieren und Auftauen auf ca. 50% der Rate unbehandelter Kontrollen abgefallen war (T_{50}).

Das Ausmaß der Schädigung und die T_{50} korrelierten gut mit dem Infiltrationsgrad der Blätter; bei vollständiger Infiltration war keine Photosynthese mehr meßbar.

3. Verwendete Chemikalien

	Bezugsquelle
Aceton, p.A	Baker
ADP-Na_3, für biochemische Zwecke (89% ADP)	Böhringer
9-Amino-Acridin (9AA)	Sigma
ADP-Na_2, für biochemische Zwecke (95% ATP)	Böhringer
ATP-Monitoring-Reagent, (LKB-No 1250-121)	LKB
Calciumcarbonat, gefällt, p.A.	Merck
Calciumchlorid, entwässert, feingekörnt rein	Merck
Caprylat (Na-Salz), z.S.	Merck-Schuchardt
L-Cystein, für biochemische Zwecke	Merck
2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Natrium (DCPIP), p.A.	Merck
1,5-Diphenylcarbazid (DPC), p.A.	Merck
Essigsäure, p.A.	Fluka
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck
D-(-)-Fructose, für Bakteriologie	Fluka
β-Fructofuranosidase (Hefesuspension), EC-Nr. 3.2.1.26	Böhringer
α-Galaktosidase (von grünen Kaffeebohnen), EC-Nr. 3.2.1.22	Böhringer
β-Galaktose-dehydrogenase (von Pseudomonas), EC-Nr. 1.1.1.48	Böhringer
D-(+)-Glucose (Monohydrat), für biochemische Zwecke	Merck
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH), (Hefesuspension), EC-Nr. 1.1.149	Böhringer

N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure, HEPES, für Laborzwecke	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat, p.A.	Merck
Kaliumhydroxid, p.A.	Merck
Kaliumhexocyanoferrat (III), p.A.	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (Griesform), p.A.	Merck
Katalase (Rinderleberkristallsuspension), p.A., EC-Nr. 1.11.1.6	Böhringer
Kupfer (II) Sulfat, wasserfrei, p.A	Merck
Magnesiumchlorid, p.A.	Merck
2-N-Morpholino-Äthansulfonsäure, MES, für Laborzwecke	Sigma
Methanol, chem. rein	Merck
Methylviologen, MV	Aldrich Chemica Company
NAD^+ (freie Säure), für biochemische Zwecke, (92% NAD^+)	Böhringer
NADP-Na_2, für biochemische Zwecke (85% $NADP^+$)	Böhringer
Natrium-L(+)-Ascorbat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat (krist.), reinst	Merck
Natriumcitrat, p.A.	Merck
Natriumchlorid (krist.), p.A.	Merck
Natriumhydrogencarbonat, p.A.	Merck
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.A.	Merck
Natronkalk (gekörnt, mit Indikator), p.A.	Merck
D,L-Phenylalanin, für biochemische Zwecke	Merck

Phenylpyruvat, z.S.	Merck
Phosphoglucose-Isomerase (Hefesuspension), EC-Nr. 5.3.1.9	Böhringer
Perchlosäure (70%), p.A.	Merck
Raffinose (Pentahydrat), für biochemische und mikrobiologische Zwecke	Merck
Rinderserumalbumin (Fraktion V, 96-99% Albumin)	Sigma
Saccharose, für biochemische und mikrobiologische Zwecke	Merck
Salzsäure, 0,1 N	Merck
Schwefelsäure, 95-97%, p.A.	Merck
Seesand (mit Säure gereinigt und geglüht), p.A.	Merck
Selengemisch nach Wieninger	Wieninger
Sorbit (Karion/Griesform), DAB 7	Merck
Tashiro-Indikator	Riedel
Titriplex III (EDTA-Na_2), p.A.	Merck
Triäthanolaminhydrochlorid (TRA), p.A.	Merck
Trichloressigsäure, p.A.	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), p.A.	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminoglycin (Tricin), p.A.	Merck

4. Methoden

4.1 Methoden für Messungen nach Frosteinwirkung in vivo

Für die einzelnen Meßverfahren wurden entweder die kältebehandelten Blätter direkt oder daraus isolierte Thylakoide verwendet.

4.1.1 Kältebehandlung ganzer Blätter

Jeweils zehn bis zwanzig von den Pflanzen abgetrennte Blätter wurden einer Behandlung in einem Kryostaten der Firma Holzwarth/Bindlach unterworfen. Der Kryostat besteht aus sechs Kammern, in denen mittels eingestellter Programme in bestimmten Zeiträumen auf verschiedene Temperaturen abgekühlt werden kann. Die folgenden Angaben gelten für die meisten der ausgeführten Experimente. Wenn Abweichungen hiervon erfolgten, ist dies bei den entsprechenden Kapiteln im Methoden- oder Ergebnisteil gesondert vermerkt. Die Blätter wurden in Plastiksäckchen eingebracht und auf die sechs Kammern des Kryostaten verteilt. Zusätzlich wurden einige Blätter als Kontrolle während des Zeitraums der Kältebehandlung bei +4 C in einer Kühlkammer aufbewahrt.

Nachdem die Proben im Kryostaten für ca 30 Minuten bei +5 C äquilibriert worden waren, wurden sie bei einer Temperaturänderung von 6 C/h auf verschiedene Verweiltemperaturen abgekühlt und nach einer Verweildauer von zwei Stunden mit der gleichen Temperaturänderung wieder auf +5 C erwärmt. Anschließend wurden die Blätter bis zur Durchführung der Messungen

bis zu 24 Stunden in der Kältekammer bei ca. +4 C verwahrt. Vorversuche hatten gezeigt, daß sich unter diesen Bedingungen der Zustand der Blätter innerhalb von zwei Tagen nicht merklich verändert. Bei den Untersuchungen, bei denen Thylakoide im gefrorenen Zustand isoliert wurden (s. 4.1.3.1), wurde das Kälteprogramm nach Ende der Verweildauer abgebrochen, ein Auftauen im Kryostaten unterblieb.

Um den Einfluß des Kälteprogramms auf das Ausmaß der Schädigung zu untersuchen, wurden in einer Versuchsserie bei Spinatblättern Gefriergeschwindigkeit, Verweildauer und Auftaugeschwindigkeit variiert (s. 5.1.6).

Bei den Untersuchungen zur Frostschädigung und Erholung ganzer Pflanzen wurden die Kälteprogramme in einer Vötsch-Klimakammer durchgeführt: Spinatpflanzen in Anzuchtkästen wurden mit einer Geschwindigkeit von 1 C/h auf die gewünschte Verweiltemperatur abgekühlt und nach einer Stunde bei dieser Temperatur bis zur ersten Messung der Photosynthese der Blätter in einer zweiten Klimakammer bei 0 C verwahrt. Danach wurden die Pflanzen für 14 Tage im Gewächshaus bei +20 C kultiviert und im Anschluß die Photosyntheserate der überlebenden oder nachgewachsenen Blätter ermittelt.

4.1.2 Messungen an intakten und frostgeschädigten Blättern

4.1.2.1 Photosynthese und Atmung

Nach der Kältebehandlung wurde ein Blatt (bzw. 4 Blätter bei *Triticum*) jeder Probe in einer abgedichteten, durchsichtigen Küvette so eingespannt, daß bei *Spinacia*, *Triticum* und *Hedera* eine kreisrunde Fläche von 15,9 cm^2 dem Luftstrom bzw. der Belichtung ausgesetzt wurde, bei *Tetragonia* von 3,15 cm^2 und bei *Viola* von 7,1 cm^2. Die Küvette wurde von einem Luftstrom (20 l/h bei *Spinacia*, *Tetragonia* und *Triticum*, 10 l/h bei *Hedera* und *Viola*) mit bekanntem CO_2-Gehalt oder von CO_2-freier Luft durchflossen. Das Gas strömte zuerst über die Unterseite, dann über die Oberseite des Blattes. Die Luft wurde vor der Messung angefeuchtet, indem sie vor der Küvette durch eine 50%ige Glucoselösung geleitet wurde. Dies entsprach einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca 90%. Für die Untersuchungen mit CO_2-freier Luft wurde ein mit Natronkalk gefülltes Glasrohr in den Luftstrom eingeschaltet. Der CO_2-Gehalt des aus der Küvette ausströmenden Gases wurde nach Trocknung in einem mit $CaCl_2$ gefüllten Glasrohr mit einem Infrarotanalysator (Unor 5N.1, Maihak/Hamburg) gemessen. Zur Ermittlung eines Nullsignals wurde der Luftstrom mittels einer "Bypass"-Schaltung an der Küvette vorbei direkt in den Analysator geschickt. Die Atmungsrate wurde aus der Differenz des Dunkelsignals und des bei der "Bypass"-Schaltung erhaltenen Signals ermittelt. Als angenäherte Rate der wahren Photosynthese wurde die Differenz des Dunkel-und Lichtsignals gemessen.

Auf das in der Küvette liegende und mit Luft überströmte Blattstück (s.v.) wurde nach KRAUSE (1973) und JENSEN (1977) ein Strahl kurzwelligen roten Anregungslichtes zentriert. Das Anregungslicht wurde von einer 240W-24V-Halogenlampe erzeugt und nach Durchtritt durch eine 6 cm dicke Wasserschicht über folgende Filterkombination geschickt:

Filtraflex K 65, 5 mm (Balzers/Liechtenstein)
RG 610,3 mm (Schott/Mainz)
Calflex C,1 mm (Balzers/Liechtenstein)
Wärmefilter, 8 mm (Leitz)
Bandbreite des resultierenden Lichtes nach KRAUSE (1973): 627-679 nm.

Die Intensität des Anregungslichtes betrug bei *Spinacia* und *Triticum* ca 45W/m^2, bei *Hedera* ca 45W/m^2, bei *Viola* und *Tetragonia* 100W/m^2. (dies entsprach einer Lichtsättigung der Photosynthese von 50% bei *Spinacia* und *Triticum*, 80% bei *Tetragonia* und *Viola* und ca 75% bei *Hedera*). Die Intensität des Anregungslichtes wurde bei einigen Arten höher gewählt, um für die Auswertung ausreichend große Signale des CO_2-Verbrauchs zu erhalten. Das Anregungslicht wurde durch einen elektrischen Verschluß (Compur-Elektronik) ein- und ausgeschaltet. Die Lichtintensität wurde mittels einer Siliconphotodiode gemessen, die mit einem Radiometer 65A (Yellow Springs Instruments) geeicht worden war.

Die Messung der Photosynthese erfolgte nach Erreichen des "Steady State". Dies war bei *Spinacia* ca 10 Minuten, bei *Hedera*, *Viola* und *Tetragonia* nach 20 Minuten und bei *Triticum* nach 30 Minuten Belichtung der Fall. Zur Messung der biophysikalischen Parameter (s.a. 4.1.2.3 und 4.1.2.1) erfolgte anschließend ein Dunkel-Lichtrhythmus von 3:2 Minuten, und zwar sowohl in CO_2-haltiger wie CO_2-freier Luft.

4.1.2.2 Transpiration

Die Messung der Transpiration wurde nur an kältebehandelten Blättern von *Spinacia* durchgeführt. Sofort nach Ende der Kältebehandlung im Kryostaten wurde ein repräsentatives Blatt jeder Probe für 10 Minuten mit einer 230V-500W-Lampe bei Zimmertemperatur belichtet, wobei der Blattstiel gewässert wurde. Anschließend wurde der Stiel am Blattrand abgeschnitten, die Schnittstelle mit Vaseline abgedichtet und das Anfangsgewicht des Blattes auf einer Präzisionswaage bestimmt. Dann wurde das Blatt bei Zimmertemperatur und Tageslicht für 3 Stunden aufbewahrt, in bestimmten Zeitabständen der Gewichtsverlust bestimmt und in % des Anfangsgewichts umgerechnet.

Ein weiteres Blatt jeder Probe wurde für die Messung der Photosynthese verwendet (s. 4.1.2.1), um ein Maß für die Frostschädigung der Probe zu erhalten.

4.1.2.3 Chlorophyll-a-Fluoreszenz

Die Chlorophyll-a-Fluoreszenz wird bei Raumtemperatur in erster Linie vom Photosystem II emittiert, das auf diese Weise einen Teil der aufgenommenen Anregungsenergie wieder abgibt. Duysens und Sweers (1963) verstanden den Anstieg der variablen Fluoreszenz bei Belichtung als Parameter für die Reduktion des primären Elektronenakzeptors Q des Photosystems II.

Zu Beginn der Belichtung findet man nach etwa 1 Sekunde eine hohe Fluoreszenzemission, die bei weiterer Belichtung nach einigen Sekunden auf ein bestimmtes stationäres Niveau abfällt (Kautsky-Effekt). Diese Löschung der variablen Fluoreszenz spiegelt bei isolierten Chloro-

plasten nach KRAUSE ET AL. (1973, 1974 UND 1982) sowie BRIANTAIS ET AL. (1979) die intra-thylakoide Protonen-Konzentration wieder und kann als Indikator für die lichtinduzierte Protonenaufnahme in die Thylakoide und dem in Gegenrichtung erfolgenden Transport von Mg^{2+}-Ionen angesehen werden. Durch den Austausch von Mg^{2+}-gegen H^{+}-Ionen erfolgen Ultrastrukturveränderungen der Thylakoidmembranen, die sich in einer zusätzlichen Verminderung der variablen Fluoreszenz äußern (MOHANTY ET AL. 1973).Nach VERNOTTE ET AL. (1981) ist an der Entstehung des Fluoreszenzsignals neben dem lichtinduzierten Protonengradienten auch der photosynthetische Elektronentransport beteiligt. Der Effekt ist energieabhängig, da nach KRAUSE (1974) bei Entkopplung der Photophosphorylierung vom Elektronentransport der Abfall der variablen Fluoreszenz unterbleibt.

Bei Blättern ist die Fluoreszenzlöschung erheblich komplexer. Nach KRAUSE (1973) spiegeln sowohl das Maximum wie der Steady State der Fluoreszenzemission die CO_2-fixierenden Aktivitäten des Blattes wieder. Die Fluoreszenzemission steigt zu Beginn der Belichtung durch die Reduktion von Q an. Die anschließende Löschung der Fluoreszenz ist offenbar zum größten Teil einer Reoxydation von Q durch das Photosystem I zuzuschreiben. Der Fluoreszenzabfall wird durch den einsetzenden H^{+}- ung Mg^{2+}-Transport weiter verstärkt. In Gegenwart von CO_2 steigt die Fluoreszenzemission nach etwa 1 Minute wieder leicht an. Diese Erhöhung wird mit dem teilweisen Abbau des H^{+}- und damit des Mg^{2+}-Gradienten erklärt, der durch die mit einer gewissen Verzögerung ("Lag"-Phase) einsetzende CO_2-Fixierung verursacht wird. Ist der Calvin-Zyklus durch eine vorhergehende Belichtung bereits aktiviert,

so kommt es durch die schnell einsetzende Reoxydation von Q zu einer Erniedrigung des Fluoreszenz-Maximums, d.h. Q wird in der Induktionsphase weniger stark reduziert.

Der Aufbau der Meßapparatur entsprach weitgehend der bei JENSEN (1977) bzw. KRAUSE (1973) beschriebenen Apparatur. Mit Hilfe eines Photomultipliers, der in einem Winkel von 45^{o} zum Anregungslicht über der Küvette plaziert war, wurde das Signal der langwelligen Chlorophyll-Fluoreszenz (Nebenbande bei ca 742 nm) registriert. Der Photomultiplier war durch folgende Filterkombination vor dem Anregungslicht (s. 4.1.2.1) geschützt:

2 Filter 5030, je 4 mm (Corning/New York)
RG 715, 3 mm (Schott/Mainz)
Filtraflex 840/13 (742 nm-Interferenzfilter, Balzers/Liech.)
Calflex C, 1 mm (Balzers/Liechtenstein)

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte parallel zur CO_2-Messung, wie bereits in 4.1.2.1 erwähnt und beschrieben. Aus den registrierten Signalen der Chlorophyll-Fluoreszenz wurde nach folgender Formel die Löschung der variablen Fluoreszenz ermittelt. (BRIANTAIS ET AL.,1979):

$$F = \frac{P - S}{S}$$

F = Fluoreszenzlöschung
P = Maximale Fluoreszenzemission während der Belichtung
S = Stationäre Fluoreszenzemission nach 2 Minuten im Licht

4.1.2.4 Apparente Absorption und Membranpotential-abhängiges Signal bei 535 nm

Bei der Belichtung von isolierten Chloroplasten oder intakten Blättern erfolgt eine relativ langsame Absorptionszunahme bei 535 nm (Heber, 1969). Hierbei handelt es sich um eine durch veränderte Lichtstreuung verursachte apparente Absorptionsänderung.

Nach Krause (1973,1974) sowie Köster und Heber (1982) gibt diese lichtinduzierte Änderung der Lichtstreuung den Aufbau des Protonengradienten durch Protonentransportvorgänge über die Thylakoidmembran und die damit verbundenen Mg^{2+}-Transportvorgänge in entgegengesetzter Richtung wieder. Da dieser Mg^{2+}-Transport aus osmotischen Gründen mit einem Wassertransport verbunden ist, kommt es zu einem Schrumpfen (im Licht) oder Anschwellen (im Dunkeln) der Thylakoide. Diese Volumenänderungen äussern sich in einem veränderten Lichtstreuungsverhalten. Eine weitere Ursache für die beobachteten Änderungen der Lichtstreuung dürften auch die gleichzeitig erfolgenden Ultrastrukturveränderungen der Thylakoidmembran spielen.

Wie bestimmte Änderungen der Chlorophyll-Fluoreszenz ist auch die langsame Lichtstreuungsänderung ein energieabhängiger Effekt (Heber:1969; Krause: 1973,1974). Denn bei Entkopplung unterbleibt der Signalanstieg. Das Lichtstreuungssignal ist damit auch ein qualitatives Maß für H^+- und Kationen-Transportvorgänge und damit für den Energiezustand des energiekonservierenden Systems.

In Gegenwart von CO_2 ist das Lichtstreuungssignal klein, da der Protonengradient durch den Verbrauch des photosynthetischen ATP im Carbonmetabolismus auf einem

niedrigen Niveau gehalten wird (KRAUSE ET AL.,1978). D.h. in CO_2-haltiger Luft bei kontinuierlicher Belichtung mit limitierender Intensität ist der Energiezustand relativ niedrig, da durch den ATP-Verbrauch der H^+-Gradient durch einen H^+-Ausstrom zur ATP-Synthese vermindert wird. Das Lichtstreuungssignal fällt daher kurz nach Belichtigungsbeginn wieder auf ein niedrigeres Niveau ab. Im CO_2-freien Milieu sind die Lichtstreuungsänderungen dagegen maximal und bleiben in dieser Höhe bis zum Ende der Belichtungszeit erhalten (HEBER: 1969, JENSEN: 1977).

Die Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung, die ihr Maximum bei etwa 520 nm hat, wurde indirekt aus dem Signal bei 535 nm ermittelt: Der schnelle Anteil des 535 nm-Signals bei Ausschalten des roten Anregungslichtes wurde als relatives Maß für die Grösse des 520 nm-Signals genommen. Es hatte bei *Spinacia* etwa eine Grösse von 60-70% des bei 520 nm aufgenommenen Signals.

Die Absorptionsänderung bei 520 nm ist ein Carotinoid-abhängiges Signal. Nach BALTSCHEFFSKY UND HALL (1974) gibt es heute zwei Hypothesen, die die Entstehung dieser Absorptinonsänderung gut erklären können:

1. Die Änderung des Absorptionsspektrums ist das Ergebnis einer Konformationsänderung in der Membran nahe der Region, wo sich die Carotinoid-Moleküle befinden.
2. Die Änderung des Absorptionsspektrums ist Folge der Entstehung eines starken elektrischen Feldes über die Membran, in der sich die Carotinoid-Moleküle befinden.

Die Grösse der Membranpotential-abhängigen Absorptionsänderung ist energieabhängig. Das Signal läßt Aussagen über die Phosphorylierungs-Bedingungen in den Chloroplasten zu, da das Membranpotential zusammen mit dem Protonengradienten als treibende Kraft der Photophosphorylierung angesehen wird. Nach JUNGE (1977) ist die Grösse des Signals dem elektrischen Membranpotential proportional.

Der Aufbau der Meßapparatur entsprach weitgehend der bei JENSEN (1977) beschriebenen Apparatur. Die Registrierung der Lichtstreuung erfolgte parallel zur CO_2-Messung. Die Änderung der apparenten Absorption als Maß für die Änderung der Lichtstreuung wurde durch hellrotes Anregungslicht (s. 4.1.2.1) induziert und mit einem schwachen grünen Meßstrahl von 535 nm gemessen, der mit Hilfe eines Bausch & Lomb -Monochromators erzeugt wurde. Der Meßstrahl gelangte nach Durchtritt durch das Blatt zu einem Photomultiplier, der direkt unter der Probenküvette montiert war. Dieser wurde durch folgende Filter vor dem Anregungslicht geschützt:

BG 18/3, 2 mm (Schott/Mainz)
9782, 8 mm (Corning/New York)
9780, 4 mm (Corning/New York)
Filtraflex B40/7 (543 mm-Interferenzfilter), 5mm (Balzer/Liechtenstein)

Die Änderung der Lichtstreuung und das Membranpotential-abhängige Signal wurden aus den Absorptionssignalen ermittelt, und zwar aus der Änderung der Absorption beim Ausschalten des roten Anregungslichtes (schnelle Absorptions-Abnahme = Membranpotential-abhängige Änderung; langsame Absorptions-Abnahme = apparente Absorptionsänderung aufgrund von Lichtstreuungsänderungen).

4.1.2.5. Chlorophyllbestimmung in Blattsegmenten

Der Teil des Blattes, der durch Anregungslicht belichtet worden war, wurde ausgeschnitten und in einem Mörser mit 3 g Sand und 50 mg $CaCO_3$ verrieben. Das Homogat wurde dreimal mit je 20 ml 80% Aceton extrahiert. Anschließend wurde das genaue Extraktionsvolumen ermittelt und ein Teil des Extraktes für 2 Minuten bei 2000xg (4000 UPM) in einer Laborzentrifuge (Christ) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 645 nm und 663 nm im Zeiss-Spektralphotometer photometriert und die im Blattstück enthaltene Chlorophyllmenge nach folgender Formel ermittelt (nach Arnon, 1949):

$$\text{mg Chlorophyll} = (E_{645} \times 20{,}2 + E_{663} \times 8{,}02) \times \text{Endvolumen des Aceton-Extraktes}$$

4.1.2.6 Bestimmung des ATP-Spiegels in Blättern

Die Extraktion von ATP aus einem Blattstück und die Messung des ATP-Spiegels wurde nur an Blattmaterial von *Spinacia* durchgeführt. Sie erfolgte im Anschluß an eine CO_2-Messung in Gegenwart von CO_2-haltiger Luft. Abgesehen von der Wahl der Küvette, der Grösse des Blattstückes und des mit Hilfe eines Wasserbads auf +20 C temperierten Luftstromes herrschten die gleichen Bedingungen wie in 4.1.2.1 beschrieben. Alle Messungen erfolgten nur in Gegenwart CO_2-haltiger Luft, zur Belichtung wurde ein Licht-Dunkel-Licht-Rhythmus von 10:3:3 Minuten gewählt.

Pro Probe wurden nach der Kältebehandlung 2 repräsentative Blätter ausgewählt und mit einer Schablone

aus jedem Blatt 5 gleichgrosse kreisrunde Blattstückchen von ca 2 cm Durchmesser ausgeschnitten. Je 2 Blattstückchen wurden anschließend einzeln in eine aus Glas bestehende Küvette mit einem Volumen von 46 ml (Höhe ca 3 cm, Durchmesser ca 5cm) eingebracht.

Die Küvette bot die Möglichkeit, während der Messung flüssigen Stickstoff einlaufen zu lassen. Am Ende der 2. Belichtung wurde das Blattstück im Licht mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einen mit flüssigen Stickstoff gefüllten Mörser überführt. Nach Zugabe von 4 ml 1 M $HClO_4$ wurde das Blattstück unter ständiger Zugabe von weiterem flüssigen Stickstoff vollständig homogenisiert (S. KÖSTER, persönliche Mitteilung).

Die homogenisierten Proben wurden nach 30 Minuten im Eisbad für 2 Minuten mit 2000xg (4000 UPM) in der Christ-Laborzentrifuge sedimentiert, der Überstand zur Bestimmung des Verlustes beim Überführen und Abgiessen der Proben und Überstände gewogen und mit einer Lösung von 1 M KOH und 0,1 M HEPES auf pH 7,3 neutralisiert. Nach erneuter Wägung und einer Stunde bei 0 C wurden die neutralisierten Proben für 5 Minuten bei 2000xg zentrifugiert und der Überstand zur ATP-Messung im LKB-Wallac-Luminometer 1250 verwendet.

Ein Blattstück wurde als Dunkelprobe für 16 Minuten bei gleichen Bedingungen im Dunkeln gehalten und anschließend ebenso zur ATP-Extraktion behandelt. Die beiden letzten Stückchen jedes Blattes wurden zur Chlorophyll-Bestimmung wie in 4.1.2.5 verwendet.

Zur ATP-Bestimmung wurden 1 ml Reaktionspuffer(100 mM TRIS, 3 mM EDTA, pH 7,75 mit Essigsäure) und 0,1 ml ATP-Monitoring-Reagent (LKB Order No. 1250-121) gemischt. Nach Schreiben einer Grundlinie wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Probenüberstand gestartet und in Volt auf einem Schreiber registriert.

Pro Überstand erfolgten zwei Parallelmessungen. Eine Eichung wurde für jede Blattprobe durchgeführt: Für einen Reaktionsansatz aus 1 ml Reaktionspuffer, 0,1 ml ATP-Monitoring Reagenz und 0,1 ml Überstand der Dunkelprobe wurden nach Schreiben der Grundlinie in kleinen Konzentrationsstufen hintereinander einige µl eines ATP-Standards (10^{-5} M ATP) zugefügt und so für jede Blattprobe eine Eichkurve ermittelt, die die Umrechnung der erhaltenen Meßwerte von Lichtproben und Dunkelprobe in nMole ATP erlaubte.

Die je zwei Meßwerte der 2 Lichtproben, der Dunkelprobe und der 2 Chorophyllbestimmungen, die zu einer kältebehandelten Blattprobe gehörten, wurden gemittelt und anschließend die ATP-Werte im Licht und im Dunkeln, sowie die Licht-Dunkel-Differenz bezogen auf mg Chlorophyll errechnet.

4.1.3 Biochemische und biophysikalische Messungen an isolierten Thylakoiden aus frostbehandelten Blättern

4.1.3.1 Isolierung der Thylakoide

Die Isolierung von Thylakoiden aus kältebehandelten Blättern erfolgte in Sorbitmedien: Jeweils 6 bis 10 g Blattmaterial wurden mit einer Schere in Streifen geschnitten und bei +4 C in 40 ml Isolierungsmedium I (330 mM Sorbit, 40 mM MES, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,4% Rinder-Serumalbumin, 10 mM Ascorbat und 50 mM L-Cystein, pH 6,1 mit NaOH) für 5 Sekunden in einem Waring-Blendor homogenisiert. Nach Auspressen des Homogenats durch 8 Lagen Verbandsmull und 20 µM Gaze wurde das Filtrat für 1 Minute bei 2000xg (4000 UPM) in einer Christ-Laborzentrifuge zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 20 ml 5mM $MgCl_2$ resuspendiert, um die Thylakoide aus den Chloroplasten freizusetzen. Nach Hinzugabe von 20 ml doppelt konzentriertem Isolationsmedium II (660 mM Sorbit, 80 mM HEPES, 20 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,8% Rinder-Serumalbumin, pH 6,7 mit NaOH) wurden durch einminütige Zentrifugation bei 170xg (1000 UPM) in der Christ-Laborzentrifuge die groben Zellfragmente sedimentiert.

Aus dem Überstand wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2000xg für 1 Minute in der Christ-Laborzentrifuge die Thylakoide sedimentiert und nach Abgiessen des Überstandes die Thylakoide in 0,5 ml Aufbewahrungsmedium (Isolationsmedium III: 330 mM Sorbit, 40 mM HEPES, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,4% Rinderserumalbumin, pH 6,7 mit NaOH) aufgenommen und im Eisbad bis zur Messung verwahrt.

4.1.3.2 Chlorophyll-Bestimmung in Thylakoid-Suspensionen

Nach Arnon (1949) wurden 20 µl Thylakoidsuspension mit einem Spatel in 10 ml 80% Aceton verrührt und die Ansätze 2 Minuten bei 2000xg (4000 UPM) in der Christ-Laborzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 645 und 663 nm photometriert. Die Chlorophyllkonzentration berechnete sich wie folgt:

$$c_{Chl\ a+b} = 20{,}2 \times E_{645nm} + 8{,}02 \times E_{663nm}$$

(c = mg/ml)

4.1.3.3 Nichtzyklischer Elektronentransport und Photophosphorylierung

Die Messung des nichtzyklischen Elektronentransports erfolgte polarographisch mit einer O_2-Elektrode als Sauerstoffentwicklung in Gegenwart von Kaliumhexacyanoferrat(III) als Elektronenakzeptor oder als O_2-Verbrauch in Gegenwart von Methylviologen als Elektronenakzeptor. Die Messung der Photophosphorylierung erfolgte entweder indirekt nach Robinson und Wiskitch (1976) oder enzymatisch.

Bestimmung nach Robinson und Wiskitch (1976) : Bei Zugabe einer begrenzten Menge von ADP wird der Elektronentransport beschleunigt. Sobald das ATP verbraucht ist, erfolgt aufgrund der Kopplung eine Hemmung des Elektronentransports. Aus dem Zeitraum, in dem die O_2-Entwicklung erhöht ist, läßt sich die Phosphorylierungsrate berechnen, aus der Steigung des Signals der Sauerstoffmessung ergibt sich die Rate der O_2-Entwicklung bzw. des Elektronentransports.

Zur Messung wurden in eine auf 20 C temperierte Küvette 3,3 ml Reaktionslösung (330 mM Sorbit, 10 mM KH_2PO_4, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES, pH 7,6 mit NaOH) und Thylakoide entsprechend 100 µg Chlorophyll gegeben. Es wurden Methylviologen (Endkonzentration: 25 µM) und NaN_3 (Endkonzentration: 1 mM) zugesetzt und die Reaktion mit rotem Anregungslicht (s.u.) gestartet. Zunächst wurde der Sauerstoffverbrauch bzw. der Elektronentransport in Abwesenheit von ADP ermittelt. Nach ca 1-2 Minuten wurden 200 nMole ADP (in 5 µl Lösung) im Licht zugegeben und der gekoppelte Elektronentransport registriert. Die ADP-Zugabe wurde mehrfach wiederholt.

Enzymatische ATP-Bestimmung: Der Ansatz in der Küvette bestand aus 3,3 ml Reaktionsmedium, 5 µl Katalase und Thylakoiden entsprechend 100 µg Chlorophyll. Die Registrierung begann im Dunkeln. Kurz vor Anstellen des roten Anregungslichtes wurden $K_3(Fe(CN)_6)$ (Endkonzentration: 1 mM) und ADP (Endkonzentration: 1,5 mM) zugegeben, dann für 2 Minuten belichtet, und der gekoppelte Elektronentransport registriert. Im Dunkeln wurden am Ende der Messung 2,6 ml der Probe entnommen und mit 0,26 ml 3,5 M Perchlorsäure zur Eiweißfällung im Eisbad versetzt. Eine Dunkelprobe wurde für den gleichen Zeitraum ohne Belichtung mitgeführt und ebenso behandelt. Nach der Proteinfällung wurden die Eiweisse bei 2000xg (4000 UPM) für 5 Minuten in einer Christ-Laborzentrifuge abgetrennt, der Überstand in vorher abgewogene Bechergläser überführt, ebenfalls gewogen und nach Zugabe von 2 ml 0,1 M TRA-Puffer und 0,5 M $KHCO_3$ auf pH 7,6 gebracht. Nach erneuter Wägung wurde der neutralisierte Überstand für 20 Minuten zur Ausfällung des $KClO_4$ in ein Eisbad gestellt und danach das $KClO_4$ bei 2000xg für 5 Minuten in einer Christ-Laborzentrifuge abgetrennt und der dabei gewonnene Überstand zur enzymatischen ATP-Bestimmung verwandt.

Der enzymatische Test erfolgte wie bei BERGMEYER (1970) beschrieben: In Gegenwart von Hexokinase wird Glucose mittels ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Mit Hilfe von $NADP^+$ und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase wird das Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat-δ-Lacton oxydiert, wobei das $NADP^+$ zu NADPH + H^+ reduziert wird. Die Entstehung des NADPH kann bei 340 nm verfolgt werden. Dabei entspricht ein Mol gebildetes NADPH einem Mol ATP.

Der Reaktionsansatz bestand aus 1 ml Überstand, 1 ml 0,05 M TRA-Puffer (pH 7,6 mit NaOH), 0,2 ml 0,1 M $MgCl_2$ (Endkonzentration: 8 mM), 0,1 ml $NADP^+$ (10 mg/ml, Endkonzentration: 7 mM), 0,1 ml 0,5 M Glucose (Endkonzentration: 20 mM) und 2,5 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Hexokinase (10 mg/ml) gestartet. Aus den Extinktionsänderungen nach Beendigung der Reaktion wurden unter Berücksichtigung des Wertes der Dunkelprobe die Phosphorylierungsraten der einzelnen Proben ermittelt.

Entkoppelter Elektronentransport: Der Ansatz zur Bestimmung des entkoppelten Elektronentransportes entsprach dem der ATP-Bestimmung nach ROBINSON UND WISKITCH (1976). Während der Belichtung wurde aber anstelle von ADP der Entkoppler NH_4Cl (Endkonzentration: 5 mM) zugegeben.

Das bei den Thylakoidreaktionen benötigte Anregungslicht stammte aus einer 240W-24V-Halogenlampe und wurde vor Erreichen der Küvette durch eine 6 cm dicke Wasserschicht sowie die Filter Calflex (1 mm) und RG 630 (3 mm) geschickt. Die Intensität des Rotlichts betrug 300 W/m^2 (Sättigungsintensität).

4.1.3.4 Aktivitäten von Photosystem I und II

Die Messung des Elektronenflusses in den Photosystemen erfolgte in einer ähnlichen Art und Weise wie bei Heber Et Al. (1973) beschrieben:

Als Maß für den Elektronenfluß im Photosystem I wurde der lichtinduzierte Sauerstoffverbrauch gemessen, der bei der Übertragung von Elektronen aus dem Photosystem I über Methylviologen auf O_2 und der anschließenden Bildung von H_2O_2 entsteht. Als Elektronendonor dient dabei Ascorbat, das seine Elektronen über DCPIP vor Photosystem I in die Elektronentransportkette eingibt.

In eine auf 20 C vortemperierte Küvette mit einer O_2-Elektrode wurden 3,2 ml Reaktionslösung (50 mM TRICIN, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM $NaHCO_3$, 5 mM Na-Ascorbat, $3x10^{-5}$ M DCPIP, 1 mM KCN, 0,4 mM Methylviologen, pH 7,6 mit NaOH und eine 100 µg Chlorophyll entsprechende Menge Thylakoide gegeben. Das Anregungslicht für die Belichtung entsprach dem in 4.1.3.3 verwendeten Rotlicht.

Der Messung des Elektronenflusses durch das Photosystem II liegt zugrunde, daß die Elektronen vom Photosystem II auf DCPIP übertragen werden. Die Reduktion des DCPIP kann photometrisch bei 560 nm verfolgt werden. Die Reduktionsrate des DCPIP kann dann als Maß für die Intaktheit des Photosystems II einschließlich des vorgeschaltetem Wasserspaltungsapparats genommen werden.

Bei dieser Reaktion kann H_2O durch 1,5 Diphenylcarbazid (DPC) als Elektronendonor des Photosystems II ersetzt werden. Man erhält so die isolierte Aktivität des Photosystems II. Ein Vergleich der DCPIP-Reduktionsraten in Anwesenheit und Abwesenheit von DPC erlaubt Aussagen über die Intaktheit des Wasserspaltungsapparates. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß DPC in einem gewissen Umfang den Elektronentransport hemmt (Klosson, Diplomarbeit 1978). Daher wurden die Raten der frostgeschädigten Proben in % einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt und in % verglichen.

In eine Küvette mit 1 cm Lichtweg, die allseitig aus Klarglas bestand, wurden 2 ml Reaktionslösung (50 mM TRICIN, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM $NaHCO_3$, $3x10^{-5}$ M DCPIP pH 7,6 mit NaOH) und eine 10 µg Chlorophyll entsprechende Menge Thylakoidsuspension gegeben. Anschließend wurde die Reduktion des DCPIP bei 560 nm im Zeiss-Spektralphotometer mit angebauter Belichtungseinrichtung gemessen.

Als Versuchsaufbau wurde ein entsprechend modifizierter Aufbau der bei HEBER UND SANTARIUS (1970) beschriebenen Einrichtung zur Messung der Hill-Reaktion verwendet: Das rote Anregungslicht stammte aus einer 24V-250W-Lampe und erreichte die Küvette nach Passage eines RG 630-Filters (3 mm, Schott/Mainz) und eines Calflex-C-Filters (1 mm, Balzers/Liechtenstein) mit einer Intensität von 150 W/m^2. Der Photomultiplier des Photometers wurde durch einen Filter 9180 (5 mm, Corning/New York) vor dem roten Anregungslicht geschützt.

In einer zweiten Meßreihe wurde dem Reaktionsmedium 1,5-DPC in einer Endkonzentration von 4 mM zugegeben.

4.1.3.5 CHLOROPHYLLFLUORESZENZ BEI 77 K

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 77 K erfolgte wie bei BEN-HAYYIM UND KRAUSE (1980) beschrieben. Man erhält ein Spektrum, das Banden bei 735, 695 und 685 nm aufweist. Diese Banden werden den Photosystemen I und II sowie dem "Light-Harvesting-Chlorophyll A/B-Protein-Komplex" zugeordnet (BUTLER UND KITAJIMA, 1975). Ein Schaden eines dieser Systeme oder eine Änderung der Membrankonfiguration führt zu einer veränderten Verteilung der einfallenden Lichtenergie und zu veränderten Verhältnissen der Höhe der Banden zueinander.

Für die Aufnahme der Tieftemperatur-Fluoreszenz-Spektren wurde ein Farrand-MK1-Spektrofluorometer mit korrigierter Emission verwendet. Proben von 50 µl Reaktionsmedium (330 mM Sorbit, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 mM HEPES, pH 6,7 mit NaOH), die Thylakoide entsprechend 5 µg/ml Chlorophyll enthielten, wurden nach 3 Minuten im Dunkeln schnell durch Zugabe von flüssigen Stickstoff gefroren.

Die Chlorophyll-Fluoreszenz bei -196 C wurde dann mit blauem Licht (480 nm, Halbbandbreite: 20 nm, Lichtintentität. ca. 15 W/m^2) angeregt und die korrigierten Emissionsspektren von 640 bis 800 nm (Halbbandbreite: 1 nm) aufgenommen.

4.1.3.6 Lichtinduzierte H^+-Aufnahme und lichtinduzierter Protonengradient

Zur Messung der lichtinduzierten Protonenaufnahme durch Thylakoide darf das Reaktionsmedium nur schwach gepuffert sein. Es wurde daher eine pufferfreie Reaktionslösung (330 mM Sorbit, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 25 µM Methylviologen, pH 7,0 mit verdünnter NaOH) verwendet. 3 ml Reaktionsmedium wurden in eine auf 20 C temperierte Küvette, in die eine pH-Elektrode eintauchte, zusammen mit einer 100 ug Chlorophyll entsprechenden Thylakoidmenge gegeben. Vor Beginn der Messung wurde jeder Probenansatz mit einer 0,01 N NaOH auf den gleichen Ausgangs-pH (pH 7,0) eingestellt. Die Belichtungseinrichtung mit rotem Anregungslicht ist in 4.1.3.3 beschrieben.

Die Eichung des Systems erfolgte durch Zugabe von 5 µl 0,001 N HCl am Ende jeder Messung zum Probenansatz und erlaubte die Berechnung der lichtinduzierten Protonenaufnahme aus den Signalen der pH-Elektrode.

Die Bestimmung des lichtinduzierten Protonengradienten erfolgte wie bei SCHULDINER ET AL. (1972) UND FIOLET ET AL. (1974) beschrieben durch Messung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz. Dabei kann die Löschung der Fluoreszenz im Licht mit dem Aufbau des Protonengradienten korreliert werden, und aus der Löschung ein Δ pH berechnet werden. Dieser errechnete Δ pH entspricht nach DE BENEDETTI UND GARLASCHI (1977) zwar nicht exakt dem tatsächlich vorliegenden Δ pH, stellt aber ein gutes relatives Maß beim Vergleich der Fähigkeit zum Aufbau eines Protonengradienten bei verschieden stark geschädigten Proben dar.

TILLBERG ET AL. (1977) gehen bei ihren Berechnungen von einem Thylakoidvolumen von 3,3 µl/mg Chlorophyll bei intakten Chloroplasten aus. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Thylakoide aus osmotisch "geschockten" Chloroplasten stammten, wurde für die Berechnungen ein Volumen von 10 µl/mg Chlorophyll angenommen.

Auf eine genaue Messung des Thylakoidvolumens konnte verzichtet werden, da für diese Arbeit nicht der absolute Δ pH-Wert, sondern die relative Änderung des Δ pH bei zunehmender Frostschädigung von Interesse war. Die so berechneten Δ pH-Werte lagen bei den ungeschädigten Kontrollen zwischen 3,6 bis 4 pH-Einheiten.

Zur Anregung des H^+-Transports diente das gleiche Licht, wie es in 4.1.3.3 beschrieben ist. Es wurde auf eine Küvette zentriert, die auf 20 C temperiert war und die Probe enthielt. Die Anregung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz erfolgte wie bei TILLBERG ET AL. (1977) mit UV-Licht geringer Intensität, das mit einer XBO-450W-Xenon-Lampe von Osram erzeugt und durch eine Wasserschicht von 8 cm und folgende Filterkombination geschickt wurde:

5874, 5mm (Corning/New York)
5860, 5mm (Corning/New York)
Wärmeschutzfilter, 8 mm (Leitzprojektor)
Transmissionsmaximum des resultierenden Lichtes: 360 nm

Dieses Fluoreszenz-Anregungslicht fiel während des gesamten Meßzeitraumes auf die in der Küvette befindliche Probe. Seine Intensität war schwach genug, um selbst keinen meßbaren Δ pH zu induzieren. Der Photomultiplier zur Messung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz stand in einem Winkel von 45° zur Probe und war nach TILLBERG ET AL. (1977) durch folgende Filter geschützt:

9782, 4,5 mm (Corning/New York)
5030, 4,5 mm (Corning/New York)
B 40-Interferenzfilter (457), 5 mm (Balzers/Liechtenstein)

Zur Messung wurden 3,2 ml Reaktionsmedium (s. 4.1.3.3) in die Küvette mit der O_2-Elektrode gegeben und nach Zugabe von Methylviologen (Endkonzentration: 25 µM) und einer 100 µg Chlorophyll entsprechenden Menge Thylakoidsuspension die Messung unter ständigem Rühren der Probe begonnen. Bei eingeschaltetem Fluoreszenzanregungslicht wurde zunächst eine Grundlinie geschrieben. Nach Zugabe von 9-Amino-Acridin (Endkonzentration: 7,5 µM) wurde dann die maximale Fluoreszenz im Dunkeln und anschließend das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung in Gegenwart des roten Anregungslichtes registriert. Die Registriergeschwindigkeit des Schreibers wurde so gewählt, daß bei anschließender Verdunklung die Kinetik der Remission der Löschung verfolgt und deren Halbwertszeit bestimmt werden konnte.

4.2 Untersuchungen an Thylakoiden nach der Frostbehandlung in Vitro

4.2.1 Isolierung von Thylakoiden aus Spinatblättern

4.2.1.1 Isolierung von Thylakoiden im NaCl-Medium nach Santarius und Ernst

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an Santarius und Ernst (1967): 1oo g gewaschene Spinatblätter wurden für 15 Sekunden im Waring-Blendor bei +4 C in 250 ml Isolationsmedium IV (350 mM NaCl, 40 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4, 10 mM Ascorbat, 50 mM L-Cystein, pH 8,0 oder 6,7 mit NaOH) homogenisiert, das Homogenat durch 20 µM Gaze und 8 Lagen Verbandsmull filtriert. Durch Zentrifugation bei 170xg (1000 UPM) für 5 Minuten in der Christ-Laborzentrifuge wurden die Zellfragmente abgetrennt und aus dem Überstand durch erneute Zentrifugation für 12 Minuten bei 600xg (2100 UPM) in der Christ-Laborzentrifuge die Chloroplasten sedimentiert. Die Chloroplasten wurden in 50 ml Isolationsmedium V (wie Medium IV, nur ohne KH_2PO_4) zum Waschen resuspendiert und bei 800xg (2500 UPM) für 12 Minuten in der Christ-Laborzentrifuge resedimentiert. Aus den gewaschenen Chloroplasten wurden dann durch Aufnahme in 2-10 ml kaltem 5 mM $MgCl_2$ die Thylakoide osmotisch freigesetzt.

4.2.1.2 Isolierung von Thylakoiden mit einem Sorbitmedium

Die Isolierung erfolgte wie in 4.1.3.1, nur in größeren Ansätzen: 100 g Blätter wurden in 250 ml Isolationsmedium I für 15 Sekunden im Waring-Blendor homogenisiert (alle übrigen Schritte s. 4.1.3.1)

4.2.1.3 Kombination einer Isolierung von Thylakoiden in einem hypotonischen Medium mit einer Kältebehandlung

200 g gewaschene Spinatblätter wurden bei +4 C in 200 ml Isolationsmedium VI (50 mM Sorbit, 60 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Ascorbat, 40 mM HEPES, pH 6,1 mit NaOH) im Waring-Blendor homogenisiert und das Homogenat durch 20 µM Gaze und 8 Lagen Verbandsmull filtriert.

Vor der weiteren Isolierung wurde das Filtrat einer Kältebehandlung unterworfen, die entweder aus einer Aufbewahrung über verschiedene Zeiträume in einem Eisbad bestand, oder mit einem Kälteprogramm im Kryostaten durchgeführt wurde.

Für die Kältebehandlung im Eisbad wurden Proben (je 50ml) bis zu 6 Stunden in ein Eisbad (0 C) gestellt, für die Kältebehandlung im Kryostaten wurden die Proben in Zentrifugengläsern mit 18 C/h von 0 C auf -10 C, -20 C, -30 C, -40 C abgekühlt, verblieben 1 Stunde bei diesen Temperaturen und wurden dann mit 18 C/h wieder aufgetaut. Als Kontrolle wurde für die Proben aus der Kältebehandlung im Eisbad eine Probe verwendet, deren Thylakoide sofort nach der Homogenisation isoliert worden waren. Bei den Experimenten mit der Kältebehandlung im Kryostaten stammten die Kontroll-Thylakoide aus einer Probe, die parallel zum Kälteprogramm bis zur Isolierung im Eisbad bei 0 C verwahrt worden war.

Die weitere Isolierung erfolgte dann mit den Isolationsmedien II und III, wie bereits in 4.1.3.1 geschildert.

4.2.1.4 Isolierung von Thylakoiden in Press-Saft aus Spinatblättern

Die Homogenisierung von 200 g Spinatblättern erfolgte in 200 ml einer Mischung aus Isolationsmedium VII und Press-Saft, pH 6,7 (zur Gewinnung des Press-Saftes s. 4.2.2.1.) bei +4 C im Waring-Blendor für 15 Sekunden. Das Isolationsmedium VII enthielt 30 mM Sorbit, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 mM HEPES, (pH 6,7 mit NaOH). Das Homogenat wurde durch 20 µM Gaze und 8 Lagen Verbandsmull filtriert. Die weitere Behandlung des Filtrats erfolgte wie in 4.2.1.3 (Isolierung im hypotonischen Medium) beschrieben.

4.2.1.5. Isolierung von Thylakoiden nach Blattaufschluß mit Seesand im Mörser

10 g Spinatblätter wurden bei +4 C im Mörser mit 10 g Seesand homogenisiert und das Homogenat den in 4.2.1.3 beschriebenen Kälteprogramm unterworfen.

Im Anschluß an das Kälteprogramm wurde das Homogenat in 40 ml Isolationsmedium Ia (330 mM Sorbit, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,4% Rinderserumalbumin, 40 mM MES, pH 6,1 mit NaOH) aufgenommen und der Sand durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 170xg in der Christ-Laborzentrifuge abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000xg sedimentiert und durch Resuspension in 20 ml 5mM $MgCl_2$ die Thylakoide osmotisch freigesetzt. Nach Auffüllen mit 20 ml Isolationsmedium II (660 mM Sorbit, 20 mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 0,8% Rinderserumalbumin 40 mM HEPES, pH 6,7 mit NaOH) erfolgten die weiteren Isolierungsschritte wie in 4.1.3.1 dargestellt.

4.2.2 Untersuchungen zur Rolle der Vakuoleninhaltsstoffe bei der Frostschädigung

Zur Untersuchung des Einflusses der Vakuoleninhaltstoffe wurden Press-Säfte verwendet, die aus Blättern gewonnen wurden. Da die Vakuole den Hauptraum der Pflanzenzelle einnimmt, darf davon ausgegangen werden, daß dieser Press-Saft (Zellsaft) überwiegend Vakuoleninhaltsstoffe enthält.

4.2.2.1 Gewinnung eines Press-Saftes aus Blättern von *Spinacia oleracea L.* und *Viola x wittrockiana Gams*

Gewaschene Blätter von *Spinacia oleracea L.* (ungehärtet und gehärtet) sowie von *Viola x wittrockiana Gams* (im Freiland gehärtet) wurden in der Kühltruhe bei -20 C gefroren und nach dem Wiederauftauen die infiltrierten Blätter im Schraubstock zwischen 2 Messingplatten durch ein Leinentuch gepreßt. Grobe Bestandteile des Press-Saftes wurden durch Zentrifugation bei 2000xg für 5 Minuten abgetrennt, der Überstand anschließend für 3 Stunden bei 15.000xg bzw. 6 Stunden bei 120.000xg in einer Ultrazentrifuge weiter gereinigt. Je nach den Erfordernissen des Experiments wurde der Zellsaft nach Zugabe von 40 mM HEPES mit NaOH auf pH 6,7 oder pH 7,6 gepuffert. Die jeweils gewählte Präparation des Zellsaftes ist bei der Darstellung der Ergebnisse mit aufgeführt.

4.2.2.2 Bestimmung von Zucker- und Proteingehalt der erhaltenen Press-Saft-Präparationen

Die Bestimmung von Glucose, Fructose, Saccharose und Raffinose erfolgte modifiziert nach Bergmeyer (1970). Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und kann ohne vorherige Trennung der Zucker vorgenommen werden. Durch Kopplung verschiedener enzymatischer Reaktionen erfolgt bei allen Bestimmungen ein Übergang von $NADP^+$ zu $NADPH+H^+$ bzw. NAD^+ zu $NADH+H^+$ der spektroskopisch bei 340 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer (PQ II) mit angeschlossenem Schreiber verfolgt werden kann und sich zu den in der Probe enthaltenen Zuckern stöchiometrisch verhält.

Zur Bestimmung von Glucose und Fructose wurden in eine Küvette mit 1 cm Lichtweg 2,7 ml Reaktionsmedium (300 mM TRA, 3 mM $MgSO_4$, 1,3 mM ATP, 1 mM $NADP^+$, pH 7,5 mit NaOH), 50 µl Press-Saft und 5 µl Hexokinase (10 mg/ml) gegeben. Nach Schreiben einer Grundlinie wurde die Glucosebestimmung mit 5 µl G-6-PDH (5 mg/ml) gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Fructosebestimmung am gleichen Ansatz mit 5 µl Phosphoglucose-Isomerase (10 mg/ml) angeschlossen.

Zur Bestimmung der Saccharose wurden in 0,1 ml Acetatpuffer (0,1 N Essigsäure, 0,05 N NaOH, pH 4,6) 10 µl Saft mit 0,1 ml β-Fructofuranosidase (2 mg/ml Acetatpuffer) für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde das Reaktionsmedium wie bei der Glucosebestimmung zugegeben und die Reaktion mit 5 µl G-6-PDH gestartet.

Zur Bestimmung der Raffinose wurden 100 µl Press-Saft mit 20 µl α-Galaktosidase (5 mg/ml) in 0,2 ml Acetatpuffer (0,1 N Essigsäure, 0,05 N NaOH, pH 4,6) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde

der Ansatz in 2,6 ml Reaktionsmedium (300 mM TRIS, 0,6 mM NAD^+, pH 8,6 mit HCl) gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Galaktose-Dehydrogenase (5 mg/ml) gestartet.

Die Proteinbestimmung erfolgte parallel in 3 Verfahren: Als Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL (modifiziert nach HILLER ET AL., 1948), als Proteinbestimmung nach LOWRY ET AL. (1951) und als Bestimmung der gebundenen Aromaten bei 280 und 260 nm nach KALCKAR (1947)

KJELDAHL: Aus 1 ml Saft wurden mit 0,1 ml konzentrierter Trichloressigsäure für 30 Minuten im Eisbad die Proteine ausgefällt, abzentrifugiert und das Sediment mit Aqua bidest. über eine Nutsche auf einen Stickstoff-freien Filter aufgebracht. Der Filter wurde in ein Kölbchen überführt und nach Zugabe von 1 ml H_2SO_4, einer Spatelspitze Selengemisch nach Wieninger und einigen Tropfen H_2O_2 für 1-2 Stunden über den Bunsenbrenner bis zur vollständigen Klarheit der Lösung verascht. Die Lösung wurde mit Aqua bidest. quantitativ in die Kjeldahl-Destillationseinrichtung überführt, 20 ml konzentrierte NaOH zugegeben und das freigesetzte NH_3 in 10 ml 0,01N HCl (mit 2-3 Tropfen Tashiro-Indikator) überdestilliert. Durch anschließende Titration dieser HCl mit 0,01 N NaOH wurde dann der NH_4Cl-Gehalt und damit der Stickstoff-Gehalt der Saftprobe ermittelt. Durch Bezug dieses Stickstoff-Gehalts auf den Stickstoff-Gehalt einer bekannten Menge Rinder-Serumalbumin, die genauso behandelt wurde, wurde dann die Proteinkonzentration im Press-Saft ermittelt.

LOWRY: 100 µl Saft wurden mit 1 ml 10% Trichloressigsäure für 30 Minuten im Eisbad versetzt und durch Zentrifugation die ausgefällten Proteine abgetrennt. Nach Trocknen des Proteinsediments wurden die Proteine in 100 µl 1 N NaOH wieder gelöst und die Probe anschließend mit 400 µl Aqua bidest. aufgefüllt.

In einem Reagenzglas wurden die 500 µl Proteinlösung mit 3 ml Reaktionslösung (50 Teile Lösung A: 2 g Na_2CO_3 in 100 ml 0,1 N NaOH und 1 Teil Lösung B: 0,5g $CuSO_4 x 5H_2O$ + 1 g Na-Citrat in 100 ml H_2O; frisch zubereitet) für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, dann 0,3 ml Folin-Reagenz (100 g Na-Wolframat + 25 g Na-Molybdat + 50 ml 85% o-Phosphorsäure + 100 ml konzentrierter HCl) zugegeben und nach weiteren 30 Minuten bei Zimmertemperatur und 1:1-Verdünnung mit Aqua bidest. gegen einen Blindwert die Extinktion bei 750 nm ermittelt. Als Standard zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde wieder Rinderserumalbumin verwendet.

KALCKAR: 100 µl Press-Saft wurden mit 1 ml 10% Trichloressigsäure für 30 Minuten im Eisbad versetzt und durch Zentrifugation die ausgefällten Proteine abgetrennt. Nach Trocknen des Proteinsediments wurden die Proteine in 100 µl 1 N NaOH gelöst und mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Extinktionen bei 260 und 280 nm ermittelt und nach folgender Formel die Proteine berechnet:

$$C_{Protein} = 1{,}55 \times E_{280} - 0{,}76 \times E_{260} \qquad (mg/l)$$

4.2.2.3 Einfluß des Press-Saftes aus Spinat- und Viola-blättern auf Spinat-Thylakoide bei +20 C

Verwendet wurde Press-Saft, der auf pH 7,6 eingestellt war. Die Bestimmung des Elektronentransports mit $K_3(Fe(CN)_6)$, der Photophosphorylierung (enzymatisch) und des Δ pH mit 9-Amino-Acridin erfolgten wie in 4.1.3.3 und 4.1.3.6 beschrieben, nur wurde das Reaktionsmedium stufenweise bis 60% durch Press-Saft ersetzt. Die Thylakoide stammten aus einer Sorbitisolierung (s. 4.2.1.2).

4.2.2.4 Einfluß des Press-Safts aus Spinatblättern auf Spinat-Thylakoide bei 0 C

Verwendet wurde Press-Saft, der auf pH 6,7 eingestellt worden war. In ein Reagenzglas wurden 0,3 ml Saft, 0,6 ml Verdünnungsmedium (50 mM NaCl, Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose wie im Saft; 40 mM HEPES, pH 6,7 mit NaOH) und 0,1 ml Thylakoidsuspension (entsprechend ca 1 mg Chlorophyll) aus der NaCl-Isolierung bei pH 6,7 (s. 4.2.1.1) gegeben. Die Endkonzentration des Saftes betrug 30%, die NaCl-Konzentration 30 mM, die Thylakoid-Konzentration entsprach ca 100 µg Chlorophyll/100 µl Ansatz. Die Proben wurden anschließend für einen Zeitraum von maximal 15 Stunden in ein Eisbad gestellt und die Inaktivierung der photosynthetischen Reaktionen (Elektronentransport mit $K_3(Fe(CN)_6)$, Photophosphorylierung (enzymatisch) und Δ pH mit 9-Amino-Acridin) in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (s.a. 4.1.3.3. und 4.1.3.6).

4.2.2.5 Einfluß des Press-Safts aus Spinatblättern auf Spinat-Thylakoide beim Frieren und Auftauen

Ein Ansatz mit 30% Press-Saft, wie in 4.2.2.4 beschrieben, oder ein Ansatz mit 90% Press-Saft (ohne Verdünnungsmedium) wurden im Kryostaten mit 18 C/h auf -10 C, -20 C, -30 C, -40 C gefroren, 1 Stunde bei diesen Temperaturen gehalten und danach mit 18 C/h wieder aufgetaut.

Die Bestimmung des Elektronentransports mit $K_3(Fe(CN)_6)$, der Photophosphorylierung (enzymatisch) und des Δ pH mit 9-Amino-Acridin erfolgte wie in 4.1.3.3 und 4.1.3.6 beschrieben.

4.2.2.6 Frost-Inaktivierung von Spinat-Thylakoiden durch NaCl in Gegenwart von Press-Saft aus Spinatblättern

Die Thylakoide wurden mittels NaCl-Isolierung bei pH 6,7 (s. 4.2.1.1) aus ungehärtetem Spinatmaterial isoliert, 0,1 ml dieser Thylakoidsuspension (entsprechend ca 1 mg Chlorophyll) wurden zu einer Gesamtmischung von 1 ml gegeben, die 0,3 ml Press-Saft (von ungehärteten oder gehärteten Spinatblättern, 40 mM HEPES, pH 6,7 mit NaOH) und 0,5 ml Verdünnungsmedium (Glucose, Fructose, Saccharose und Raffinose wie im Saft, 40 mM HEPES, pH 6,7 mit NaOH) enthielt. Die restlichen 0,1 ml wurden in wechselnden Verhältnissen mit einer 2,5 M NaCl-Lösung und Aqua bidest aufgefüllt, um eine Reihe mit aufsteigender NaCl-Konzentration zu erhalten. Die Proben wurden mit 18 C/h im Kryostaten auf -20 C gefroren, nach einer Stunde mit der gleichen Geschwindigkeit wieder aufgetaut und an den Thylakoiden der Elektronentransport mit $K_3(Fe(CN)_6)$ sowie die Photophosphorylierung (enzymatisch) bestimmt.

4.2.3 Frieren und Auftauen von Thylakoiden in Gegenwart von Schutz- und Schadstoffen

4.2.3.1 Saccharose und Salzionen

Die hierfür verwendeten Thylakoide stammten aus einer NaCl-Isolierung bei pH 8,0 (s. 4.2.1.1). Die Thylakoide wurden in Gegenwart von 50 mM NaCl und 40 mM HEPES (pH 8,0) bei verschiedenen Saccharose-Konzentrationen mit 6 C/h auf -10 C gefroren oder mit 50 mM NaCl, 40 mM HEPES (pH 8,0) bei konstanter Saccharosekonzentration mit 6 C/h auf verschiedene Temperaturen gefroren. Nach 1 Stunde wurden die Proben mit 6 C/h wieder aufgetaut und die Thylakoide der Messung der photosynthetischen Reaktion wie in 4.1.3.3 und 4.1.3.6 beschrieben zugeführt.

Analog wurden Thylakoide behandelt, die in Gegenwart von 100 mM Saccharose, 40 mM HEPES (pH 8,0 mit NaOH) und steigender $MgCl_2$-Konzentration mit 18 C/h auf -20 C gefroren und nach einer Stunde mit der gleichen Geschwindigkeit wieder aufgetaut worden waren.

4.2.3.2. Saccharose und Caprylat, Phenylalanin oder Phenylpyruvat

Die hierfür verwendeten Thylakoide stammten aus einer NaCl-Isolierung bei pH 8,0 (s. 4.2.1.1). Die Thylakoide wurden in Gegenwart von 100 mM Saccharose und 40 mM HEPES (pH 8,0 mit NaOH) mit verschiedenen Konzentrationen von Caprylat, Phenylalanin oder Phenylpyruvat mit 12 C/h auf -20 C im Kryostaten gefroren, 1 Stunde bei dieser Temperatur gehalten und mit 12 C/h wieder aufgetaut. Die Messung der photosynthetischen Reaktionen erfolgte wie in 4.1.3.3. und 4.1.3.6 beschrieben.

4.2.4 Untersuchungen an kältebehandelten Thylakoiden aus besonderen Isolierungsverfahren

Kältebehandelte Thylakoide aus Blattaufschlüssen mit Seesand (4.2.1.5), aus Isolierungen in Gegenwart von Press-Saft (4.2.1.4) oder in hypotonischen Medien (4.2.1.3) wurden hinsichtlich ihrer photosynthetischen Aktivität untersucht. Die Bestimmung des Elektronentransports mit $K_3(Fe(CN)_6)$, der Photophosphorylierung (enzymatisch) und des Δ pH mit 9-Amino-Acridin erfolgte wie in 4.1.3.3 und 4.1.3.6 beschrieben. Details der Kältebehandlung sind im Ergebnisteil angegeben.

5. Ergebnisse

Zur besseren Übersichtlichkeit und zum Verständnis des Aufbaus der Arbeit werden die Ergebnisse bereits in diesem Kapitel einer Wertung unterzogen. Im Kapitel "Diskussion" (s. 6.) werden die im Ergebnisteil gewonnen Schlußfolgerungen zusammengefaßt und abschließend beurteilt.

5.1 Frostschädigung von Spinatblättern

Die hier dargestellten Experimente bauen z.T. auf den in der Diplomarbeit beschriebenen Ergebnissen (Klosson, 1978) auf. Um die Kenntnis des Mechanismus der Frostschädigung zu erweitern, wurde der Verlauf der Schädigung anhand verschiedener Parameter im Detail untersucht. Es handelt sich um repräsentative Kurven der Schadensverläufe aus einer grossen Anzahl von Experimenten. Um einen Vergleich der Frostschädigung verschiedener Parameter untereinander zu erlauben, wird als Bezug meist der Verlauf der Photosynthese-Inaktivierung im betreffenden Experiment aufgeführt. Wie in der Diplomarbeit (Klosson, 1978) gezeigt werden konnte, ist die Inaktivierung der photosynthetischen CO_2-Assimilation ein charakteristischer Parameter der Frostschädigung ganzer Blätter. In ca 50% der Experimente (sowohl in der Diplomarbeit wie auch bei den zu dieser Arbeit durchgeführten Versuchen) erscheint die Photosynthese sogar als der empfindlichste Parameter der Frostschädigung. Darauf wird in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen werden.

In der Regel werden in den Abbildungen Experimente mit ungehärteten und gehärteten Spinatblättern gegenübergestellt. Sofern es bei der Beschreibung der Ergebnisse nicht ausdrücklich anders erwähnt ist, sind beim Vergleich der Schadensmuster keine Unterschiede zwischen ungehärteten und gehärteten Material festzustellen. Nur die Temperatur, bei der die Frostschädigung einsetzt, liegt bei gehärteten Blättern tiefer als bei ungehärteten Blättern.

5.1.1 Eisbildung in Spinatblättern während des Frierens

Es ist bekannt, daß pflanzliche Gewebe z.T. erheblich unter 0 C unterkühlt werden können, ehe Eisbildung einsetzt. LARCHER (1981B) berichtet, daß infolge der Unterkühlung die Eisbildung in den Blättern bei den meisten Pflanzen zwischen -5 bis -12 C, in tierischen Zellen zwischen -3 bis -8 C (LOVELOCK, 1953B) einsetzt. In den folgenden Experimenten sollte nun geprüft werden, ob die Frostschädigung der Blätter bei Spinat mit dem Beginn der Eisbildung zusammenfällt, oder ob Eisbildung im Gewebe während des Frierens toleriert werden kann. Zwar erfolgt die Eisbildung beim langsamen Frieren in den Interzellularen und nicht in den Zellen, trotzdem wäre eine mechanische Schädigung der Zellen durch einen Druck der Kristalle von außen auf die Zelle denkbar (s.a. SCARTH UND LEVITT, 1937). Außerdem bedeutet der Beginn der interzellularen Eisbildung auch den Beginn der Dehydratation der Zellen, die als schädigend angesehen wird (HEBER, 1968; SIMINOVITCH, 1981).

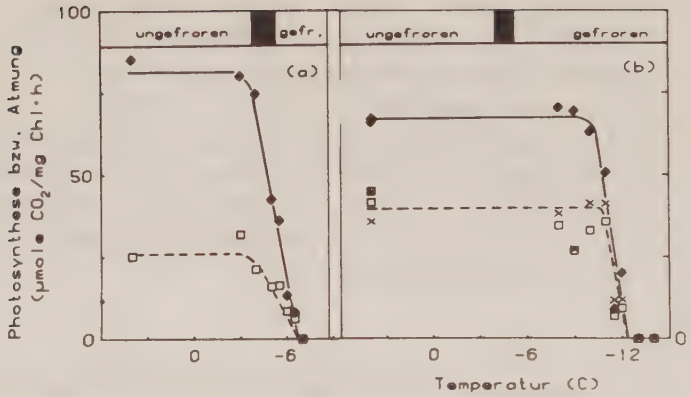

ABB. 1A,B: Photosynthese und Atmung ungehärteter (a) und gehärteter (b) Spinatblätter nach der Kältebehandlung (s. 4.1.1). Die Raten der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (——◆——) und der respiratorischen CO_2-Entwicklung im Dunkeln in Gegenwart (- - -□- - -) wie in Abwesenheit (- - -×- - -) von 300 µl CO_2/l Luft sind als Funktion der tiefsten erreichten Temperatur des Kälteprogramms (sog. Verweiltemperatur) aufgetragen. Da sich die Raten der Atmung in Gegenwart und Abwesenheit von CO_2 nur unwesentlich unterscheiden, sind sie zu einer Kurve zusammengefaßt. Über den Kurven der Photosynthese und Atmung ist angegeben, bei welchen Temperaturen die sichtbare Eisbildung in den Blättern einsetzte.
Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je ca 50 Experimenten.

Wie bereits in der Diplomarbeit (KLOSSON, 1978) beschrieben, werden Photosynthese und Atmung durch die Kältebehandlung bei bestimmten Verweiltemperaturen vollständig inaktiviert. Eine Steigerung der Atmung nach der Kälteeinwirkung, wie sie LARCHER (1983) beschreibt, konnte nicht beobachtet werden. Abb. 1 zeigt, daß der Temperaturbereich zwischen beginnender und vollständiger Schädigung nur 2 bis maximal 4 Gradeinheiten beträgt. Er liegt bei ungehärteten Blättern

zwischen -5 C und -7 C, bei gehärteten Blättern zwischen -10 C bis -13 C. Wenn Photosynthese und Atmung vollständig inaktiviert sind, erscheint das Blatt äußerlich voll infiltriert.

Zusätzlich ist dieser Abbildung zu entnehmen, bei welchen Temperaturen in den Blättern eine sichtbare Eisbildung beobachtet werden konnte. Die Eisbildung setzte bei ungehärteten wie bei gehärteten Material bei denselben Temperaturen ein: -4 C bis -5,5 C. Die Eisbildung fällt bei den ungehärteten Blättern mit der Inaktivierung von Photosynthese und Atmung zusammen, während sie bei dem gehärteten Material vor Einsetzen der Inaktivierung erfolgt. Das bedeutet, daß nur die gehärteten Blätter eine deutliche Frosttoleranz besitzen.

5.1.2 Transpiration in Abhängigkeit vom Ausmaß der Frostschädigung

Als denkbare Ursache der Hemmung der Photosynthese kommt ein Schließen der Stomata aufgrund der Frostbehandlung in Frage bzw. ein verzögertes oder unvollständiges Öffnen der Spaltapparate nach der Frosteinwirkung (s. a. Larcher, 1983). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die Transpiration der Blätter vor und nach der Frosteinwirkung untersucht.

Abb. 2 zeigt, daß bei Schädigung der gefrorenen Blätter die Transpiration nach dem Wiederauftauen stark ansteigt. Dies wird besonders deutlich, wenn die Wasserabgabe über einen längeren Zeitraum (3 h) verfolgt wird. Die Transpiration stark geschädigter Blätter zeigt dann etwa den doppelten Wert der ungefrorenen Kontrollen. Blätter mit verstärkter

Transpiration wiesen gleichzeitig auch eine stärkere Infiltration auf. Blätter, die dem gleichen Kälteprogramm unterworfen worden waren wie die zur Messung der Transpiration ausgewählten Blätter, zeigten im Temperatur-Bereich zunehmender Transpiration eine zunehmende Inaktivierung der Photosynthese.

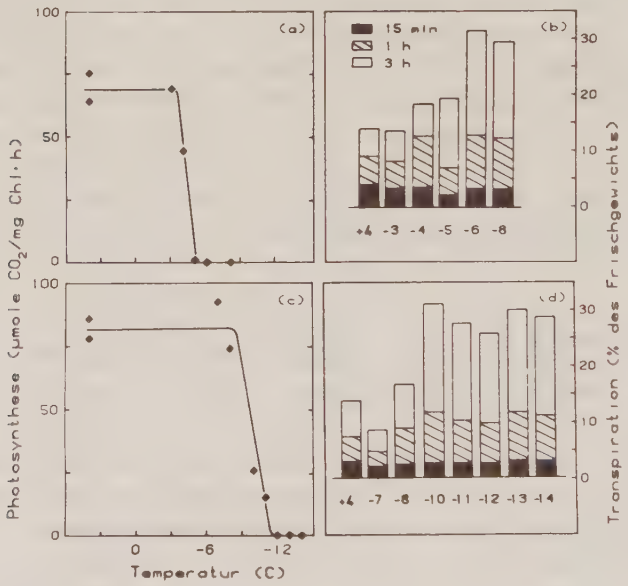

ABB. 2A, B: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Transpiration ungehärteter (b) und gehärteter (d) Spinatblätter. Die Säulen geben den Wasserverlust in % des Frischgewichts wieder, wie er bei Aufbewahrung der Blätter bei Raumtemperatur 15 Minuten, 1 und 3 Stunden nach der Kältebehandlung beobachtet wurde. Unter den Säulen ist die tiefste erreichte Temperatur des Kälteprogramms in C angegeben (sog. Verweiltemperatur). Zum Vergleich sind die Photosyntheseraten von Parallelproben ungehärteter (a) und gehärteter (c) Spinatblätter der gleichen Experimente nach der Kältebehandlung aufgeführt, um einen Überblick über das Ausmaß der Frostschädigung zu geben. Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

5.1.3 Einfluß der Frostbehandlung auf den nichtzyklischen Elektronentransport, die Photophosphorylierung und die Pigmentsysteme der Photosynthese

In der Literatur gibt es Hinweise, daß die Frostschädigung von Thylakoiden in vivo anders als in vitro verläuft (s.u.a. Heber und Santarius, 1964; Heber und Ernst, 1967; Heber, 1967; Klosson, 1978). Da es Unklarheiten bezüglich der unterschiedlichen Mechanismen gibt (s. Einleitung), wurde in detaillierteren und mehr Meßparameter umfassenden Experimenten diese Fragestellung erneut untersucht. Die Experimente bestätigen z.T. frühere Ergebnisse. Durch die Kombination mit neuen Parametern werden sie aber einer detaillierteren Interpretation zugänglich gemacht.

Der gekoppelte Elektronentransport und die Photophosphorylierung werden in vivo in nahezu gleichem Umfang mit zunehmender Frostschädigung inaktiviert (Abb. 3a, b). Diese Inaktivierung erfolgt annähernd parallel zum Abfall der Photosyntheserate (in Abb. 3 nicht dargestellt: s. Klosson, 1978).

Die gleichmäßige Schädigung von gekoppelten Elektronentransport und Photophosphorylierung durch die Kältebehandlung kann man in Abb. 3 besonders gut an der Kopplung erkennen, die auch bei teilgeschädigten Blättern noch etwa den Wert der ungeschädigten Kontrollen erreicht. Zusätzlich zeigt Abb. 3, daß ebenso wie der gekoppelte auch der mit NH_4Cl entkoppelte Elektronentransport zusammenbricht. Dieser ist ein Maß für die Kapazität des Elektronentransportsystems. Die "Frostunempfindlichkeit" der Kopplung ist in diesen Experimenten deutlicher als in früheren Untersuchungen zu sehen (s. Klosson, 1978). Es handelt sich hier um ein wichtiges Ergebnis der Untersuchungen

zur Frostschädigung in vivo, denn in vitro ist die Entkopplung das primäre Anzeichen der Frostschädigung (HEBER UND ERNST, 1967: HEBER, 1967 UND 1968). War es bisher auch denkbar, daß der Abfall der Rate des Elektronentransports eine Folge der Hemmung der Photophosphorylierung ist, so zeigt der Verlauf des entkoppelten Elektronentransportes mit zunehmender Frosteinwirkung, daß es in vivo zu einer direkten Schädigung der Elektronentransportkette durch Frost kommen muß.

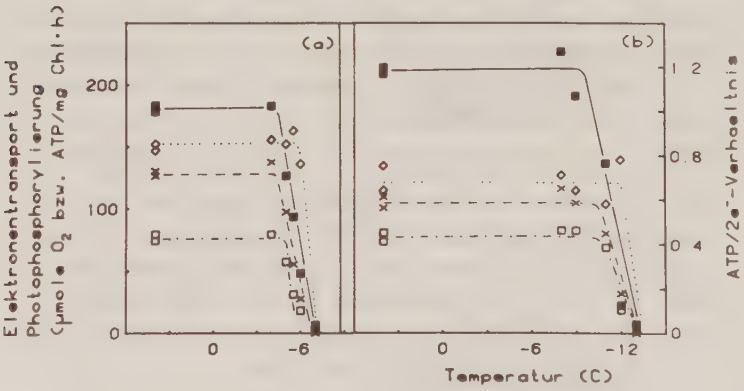

ABB. 3A, B: Einfluß der Kältebehandlung auf den nichtzyklischen Elektronentransport und die Photophosphorylierung von Thylakoiden, die nach der Kältebehandlung aus ungehärteten (a)und gehärteten (b) Spinatblättern nach 4.1.3.1 isoliert wurden. Die Raten sind als Funktion der tiefsten erreichten Temperatur des Kälteprogramms (Verweiltemperatur) angegeben. —·—□—·— Elektronentransport nach Zugabe von 2oo nMolen ADP zum Reaktionssatz (zur experimentellen Durchführung s. 4.1.3.3) in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und Methylviologen als Elektronenakzeptor (25 µM; Sauerstoffaufnahme); ——■—— entkoppelter Elektronentransport in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 5 mM NH_4Cl (s. 4.1.3.3); – – –×– – – Photophosphorylierung (Raten indirekt nach ROBINSON UND WISKITCH bestimmt, s. 4.1.3.3). ····◇····· Kopplung (ATP/$2e^-$). Alle Werte sind Mittelwerte aus 2 Messungen. Abkürzungen: Chl = Chlorophyll, h = Stunde.

Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je ca 20 Experimenten.

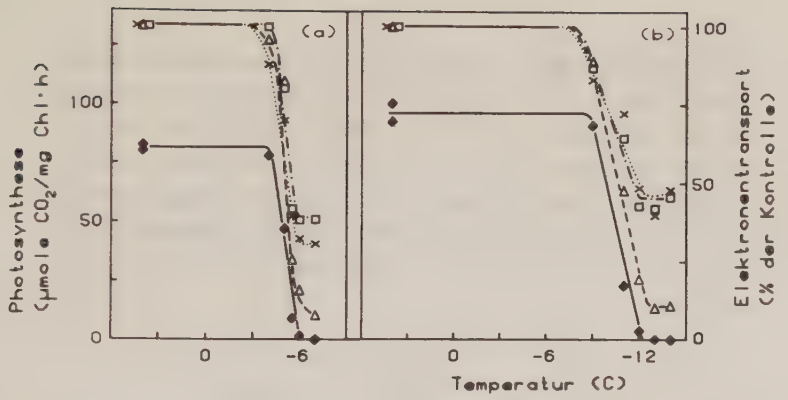

Abb. 4a, b: Einfluß der Kältebehandlung auf Teilreaktionen der Elektronentransportkette, gemessen an Thylakoiden, die nach der Kältebehandlung aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern nach 4.1.3.1 isoliert wurden. Die Elektronentransportraten sind in % der unbehandelten Kontrollen als Funktion der tiefsten erreichten Temperatur des Kälteprogramms (Verweiltemperatur) aufgetragen. – – –Δ– – – Elektronentransport von Wasser zu DCPIP (Wasserspaltung und Photosystem II); die Kontrollraten betrugen 118 (a) bzw. 106 (b) µMole DCPIP/mg Chl u. h —·—·□—·—·Elektronentransport von 1,5-Diphenylcarbazid zu DCPIP (Photosystem II); die Kontrollraten betrugen 94 (a) bzw. 83 (b) µMole DCPIP/mg Chl u. h. ·····✕····· Elektronentransport von Ascorbat + DCPIP über Methylviologen zu O_2 (Photosystem I); die Kontrollraten betrugen 236 (a) bzw. 177 (b) µMole O_2/mg Chl u. h (Aufnahme). Alle Raten sind der Durchschnitt aus 2 Messungen. Die Kontrollraten von je 2 Messungen von 2 verschiedenen Thylakoid-Isolierungen. Zusätzlich sind die Photosyntheseraten von Blättern wiedergegeben, die der gleichen Kältebehandlung unterworfen worden waren wie die Blätter, aus denen die Thylakoide isoliert worden waren (————◆————)
Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je 2 Experimenten.

Abb. 4 stellt die Frostschädigung der beiden Photosysteme und des Wasserspaltungssystems dar: Der Elektronentransport in beiden Photosystemen (Photosystem II von Diphenylcarbazid zu DCPIP, Photosystem I von DCPIP/Ascorbat zu Methylviologen) wird durch Frost im etwa gleichen Ausmaß gehemmt, ihre Elektronentransportraten bleiben aber auch in schwer geschädigten Blättern

noch relativ hoch. Dagegen ist der Wasserspaltungsapparat der empfindlichste Teil des Elektronentransportsystems, wie die stark verminderten Raten des Elektronentransports von Wasser zu DCPIP bei Thylakoiden aus stark geschädigten Blättern zeigen. Damit haben sich die auf Grund eines Vorversuches in der Diplomarbeit (KLOSSON, 1978) geäußerten Vermutungen bestätigt.

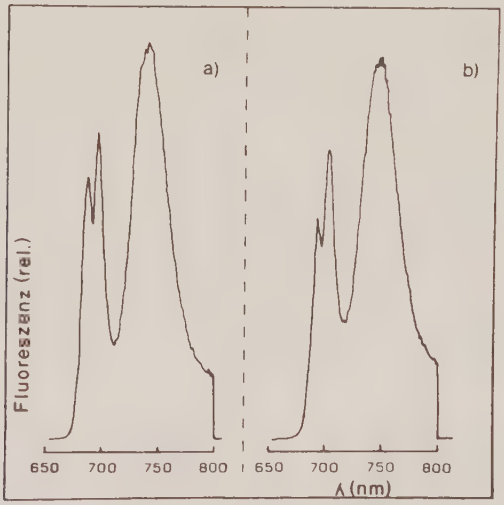

ABB. 5 : Spekten der Fluoreszenzemission bei 77K von kältebehandelten gehärteten Spinatblättern (experimentelle Daten s. 4.1.3.5). Dargestellt sind die Spekten einer unbehandelten Kontrolle (+4C, Rate der CO_2-Fixierung: 100,4 µMole CO_2/mg Chl u. h) und einer kältebehandelten Probe (-13C, Rate der CO_2-Fixierung: 0 µMole CO_2/mg Chl u. h)

Die gleichmäßige Schädigung der beiden Photosysteme durch Frost bestätigen auch Abb. 5 und 6. Veränderungen der relativen Intensität der drei Fluoreszenz-Banden, die auf eine unterschiedliche Schädigung der beiden Photosysteme und des "Light Harvesting Protein Chlorophyll Complex" deuten würden, konnten nicht nachgewiesen werden (s. a. Methoden, 4.1.3.5).

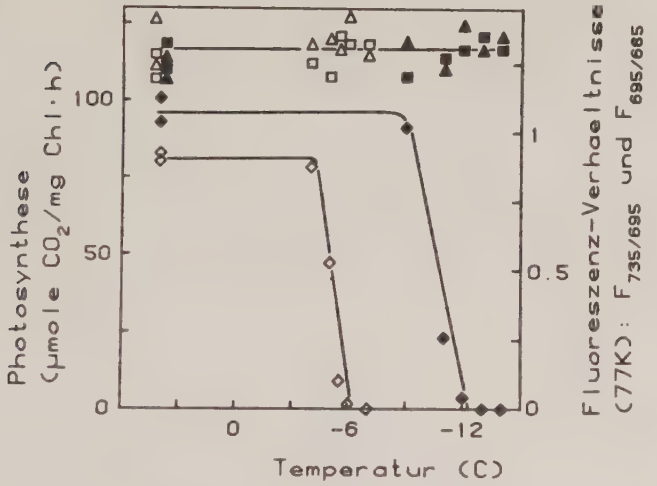

Abb. 6: Fluoreszenzemission bei 77K von Thylakoidmembranen aus kältebehandelten Spinatblättern. Die Höhe der Banden bei 735 und 695 nm sind als Verhältnis F735/695 (△——▲——) und bei 695 und 685 nm als Verhältnis F695/685 (□——■——) ausgedrückt und als Funktion über die tiefste erreichte Temperatur des Kälteprogramms (Verweiltemperatur) aufgetragen. Zum Vergleich sind die Photosyntheseraten von Blättern aufgeführt, die der gleichen Kältebehandlung unterworfen worden waren wie die Blätter, aus denen die Thylakoide isoliert worden waren(◇——◆——). Offene Symbole stehen für ungehärtete Blätter, ausgefüllte Symbole für gehärtete Blätter.
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten.

5.1.4 Einfluß der Frostbehandlung auf die lichtinduzierte H^+-Aufnahme und den lichtinduzierten Protonengradienten

In früheren Frostexperimenten (Klosson, 1978) gab es Hinweise auf eine geringere Hemmung der H^+-Aufnahme und des Protonengradienten im Vergleich zu den übrigen Parametern der Photosynthese. In den hier dargestellten Experimenten sollte nun die Frage geklärt werden, ob es nach der Frostschädigung in vivo zu einer erhöhten Durchläßigkeit der Thylakoidmembran für H^+ kommt, wie es Heber (1967 und 1968) für die Frostschädigung in vitro nachgewiesen hat.

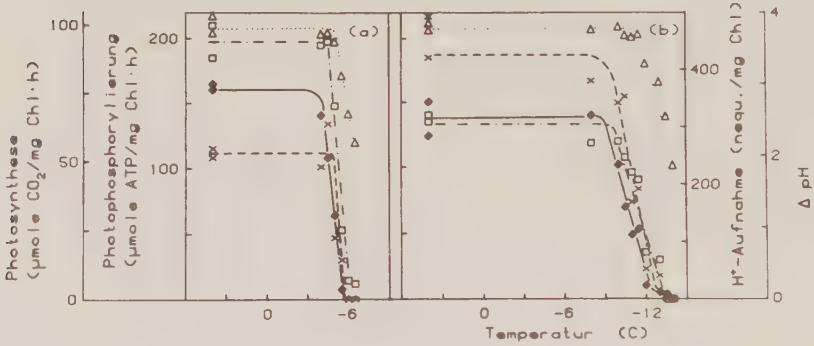

Abb. 7A, B: Lichtinduzierter Protonengradient (Δ pH), H^+-Aufnahme und Photophosphorylierung von Thylakoiden, die nach der Kältebehandlung aus ungehärteten (a) und frostgehärteten (b) Spinatblättern isoliert wurden, aufgetragen als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms. ·····△····· Δ pH, berechnet aus der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz im Licht (s. 4.1.3.6). -·-·-□-·-·-·- Lichtinduzierte H^+-Aufnahme, gemessen mit einer pH-Elektrode. – – ✕ – – – Photophosphorylierung beim nichtzyklischen Elektronentransport in Gegenwart von 200 nMolen ADP, 10mM KH_2PO_4 und 25 µM Methylviologen als Elektronenakzeptor (indirekte Bestimmung nach Robinson und Wiskitch, s. 4.1.3.3). Photosyntheseraten von Blättern dieser Proben nach der Kältebehandlung (———◆———). Übrige experimentelle Daten wie für Abb. 3.
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl von 8 (a) bzw. 6 (b) Experimenten.

Abb. 7 bestätigt die Befunde der Diplomarbeit (KLOSSON, 1978), daß der Δ pH (berechnet aus der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz von Thylakoiden aus frostbehandelten Blättern) durch Frost weniger stark betroffen wird als die übrigen photosynthetischen Parameter. Dagegen fällt die lichtinduzierte H^+Aufnahme parallel zu den mit dargestellten Parametern Photophosphorylierung und Photosynthese ab.

Für die Ergebnisse sind zwei Erklärungen möglich. Zum einen könnten die Thylakoide auch bei abnehmender H^+-Aufnahme (infolge des verringerten Elektronentransports) noch einen meßbaren ΔpH aufbauen, wenn die Thylakoidmembran hinsichtlich der H^+-Durchläßigkeit intakt bleibt. Zum anderen ist denkbar, daß bei geringer H^+-Transportleistung der pK der inneren Thylakoidoberfläche nicht erreicht wird. Da dann weniger H^+-Ionen weggepuffert werden, reicht eine relativ geringe Anzahl H^+-Ionen zum Aufbau eines hohen Δ pH aus.

Einer Entkopplung des Elektronentransports von der Photophosphorylierung entspricht nach der chemiosmotischen Hypothese (MITCHELL, 1966) eine Erhöhung der Membrandurchläßigkeit für Protonen. Dies bedingt eine verkürzte Halbwertzeit der Umkehr der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz bei Ausschalten des Anregungslichtes. In Abb. 8 erkennt man aber, daß die Halbwertzeit mit zunehmender Schädigung nicht abnimmt, sondern eher größere Werte als die Kontrolle annimmt.

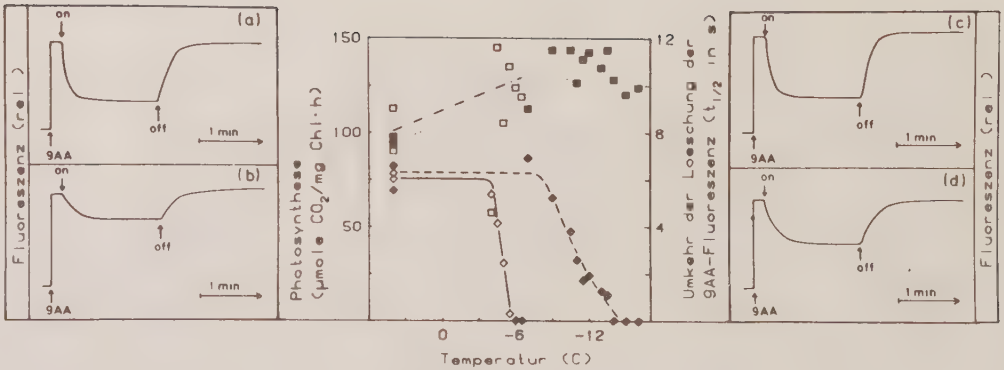

Abb. 8: Einfluß der Frostbehandlung auf die Kinetik der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz. Die Untersuchungen erfolgten an Thylakoiden aus frostbehandelten ungehärteten (offene Symbole) und gehärteten (ausgefüllte Symbole) Spinatblättern. Als Maß für die Kinetik wurde die Halbwertzeit der Umkehr der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung bei Ausschalten des photosynthetischen Rotlichtes (s.a. 4.1.3.6) als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms angegeben (□-·-·-· ■······). Zusätzlich wurde nach der Kältebehandlung die photosyntetische CO_2-Aufnahme der Blätter(——◇—— - -◆- -) gemessen, die dem gleichen Kälteprogramm unterworfen worden waren wie die Blätter, aus denen die Thylakoide isoliert worden waren.
In den Teilen a - d sind Originalsignale der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz von Thylakoiden wiedergegeben: Ungehärtete Kontrollblätter (a), ungehärtete Blätter, die auf -5,5 C gefroren wurden (b), gehärtete Kontrollblätter (c) und gehärtete Blätter, die auf -13 C gefroren wurden (d)

5.1.5 ATP-Spiegel in frostbehandelten Spinatblättern

Charakteristische Änderungen der Lichtstreuung und der Chlorophyll-Fluoreszenz bei teilgeschädigten Blättern (im Vergleich zu den Signalen der ungefrorenen Kontrollen, s. Klosson, 1978) führten zu dem Schluß, daß in frühen Stadien der Frostschädigung die CO_2-Assimilation bereits verringert wird, ehe eine Inaktivierung des energiekonservierenden Systems der Photosynthese einsetzt. Auch der Vergleich der photosynthetischen Aktivitäten der Thylakoide mit der Photosynthese der Blätter in Abb. 4 und 7 legt diesen Schluß nahe. Um hierzu einen direkten Beweis zu liefern, wurden die ATP-Spiegel in frostgeschädigten Blättern nach der Kältebehandlung und in ungefrorenen Kontrollen bestimmt.

In Abb. 9 ist zu sehen, daß im "Steady-State" bei Licht wie im Dunkeln die ATP-Spiegel nur bei den Blättern erniedrigt sind, die nur noch eine sehr geringe photosynthetische CO_2-Assimilation zeigen. Dagegen finden sich in teilgeschädigten Blättern mit einer deutlich erniedrigten CO_2-Assimilation nahezu gleich hohe ATP-Spiegel wie in den ungefrorenen Kontrollen. Auch die Licht-Dunkel-Differenz der ATP-Spiegel wird erst bei stärkerer Schädigung vermindert. Mit Ausnahme des Temperaturbereichs, in dem die Schädigung erfolgt, lassen sich keine Unterschiede zwischen ungehärteten und gehärteten Blättern feststellen. Wegen des größeren Bereichs der Teilschädigung ist der Schadensverlauf bei gehärteten Blättern deutlicher zu erkennen. Das Experiment zeigt also eine von der photosynthetischen Energiekonservierung unabhängige Hemmung der CO_2-Fixierung durch Frost.

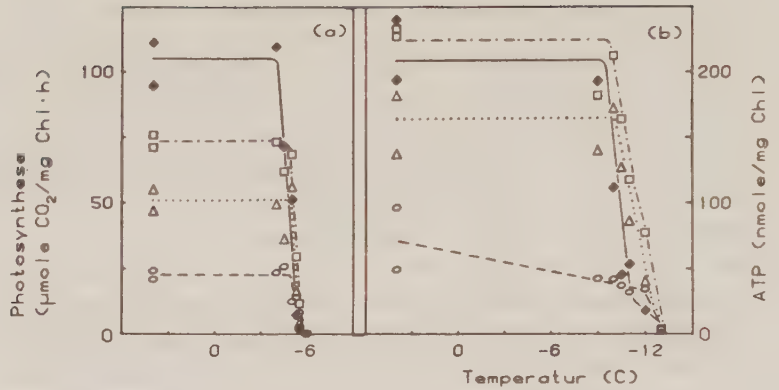

ABB. 9A, B: ATP-Spiegel im "Steady-State" in kältebehandelten ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern. Nachdem die Reaktion im "Steady-State" mit flüssigen Stickstoff gestoppt worden war, wurden die Proben mit $HClO_4$ extrahiert und ATP mit einem Luciferin/Luciferase-Test bestimmt (experimentelle Durchführung s. 4.1.2.6). Die Kontrollwerte (+4 C) im Licht sind Mittelwerte von Messungen an je 2 Segmenten aus 2 Blättern, bei allen anderen Proben an 2 Segmenten aus einem Blatt. Ein weiteres Segment von jedem Blatt wurde analog zur Messung des ATP-Spiegels im Dunkeln verwendet. -·-·□-·- ATP-Spiegel im Licht; ·····△····· ATP-Spiegel im Dunkeln; — —○— —Licht-Dunkel-Differenz der ATP-Spiegel; ——◆—— Photosyntheserate.
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl aus 3 (a) bzw. 2 (b) Experimenten.

Abb. 9 erhärtet frühere Vermutungen (KLOSSON, 1978, KLOSSON UND KRAUSE, 1981A), daß die CO_2-Fixierung das empfindlichste Reaktionssystem des gesamten photosynthetischen Prozesses ist. Erst bei etwas tieferen als die zur Hemmung der CO_2-Fixierung führenden Temperaturen kommt es auch zu einer schweren Schädigung des energiekonservierenden Apparats der Chloroplasten und parallel dazu auch der Mitochondrien (s.a. THEBUD UND SANTARIUS, 1981A), so daß die ATP-Spiegel im Licht wie im Dunkeln zusammenbrechen.

5.1.6 Frostschädigung von Spinatblättern in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Frierens und Auftauens sowie der Verweildauer bei tiefen Temperaturen

In früheren Publikationen (s. Santarius und Heber, 1970) wurde berichtet, daß bei intakten Zellen die Frier- und Auftaugeschwindigkeit sowie die Verweildauer bei der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms großen Einfluß auf das Überleben der Zellen haben. In In-Vitro-Experimenten erwies sich die Frostinaktivierung der Photophosphorylierung der Thylakoide ebenfalls als zeitabhängig (Heber und Kempfle, 1970).

Während des Frierens konkurrieren zwei Mechanismen miteinander: Die Zunahme der Konzentration von schädigenden Zellinhaltsstoffen und die Verlangsamung der inaktivierenden Prozesse mit fallender Temperatur. Ein Maximum der Schädigung von Thylakoiden wurde in diesen Untersuchungen bei einer Temperatur von -12 C beobachtet (Santarius und Heber, 1970). Im darunterliegenden Temperaturbereich war die Frostschädigung wieder geringer. Beim schnellen Frieren war die Schädigung der Thylakoide geringer als beim langsamen Frieren, da beim schnellen Frieren die Exposition der Thylakoide im kritischen Temperaturbereich, in dem die Inaktivierung zum größten Teil erfolgt, verringert ist. Lovelock (1953 a und b) spricht von einer kritischen Temperaturregion zwischen -4 und -40 C, deren Dauer beim Frieren und Tauen der Zellen einen großen Einfluß auf das Ausmaß der Frostschädigung haben soll. Dagegen berichten andere Autoren (Sprague, 1955; Mazur und Schmidt, 1968), daß bei Pflanzenteilen und -Zellen ein schnelles Frieren schädigender wirkt als langsames Frieren, da es beim schnellen Frieren zu einer intrazellulären Eisbildung kommt. Für das Auftauen verhält es sich dagegen genau umgekehrt, da es beim langsamen Auftauen zu einer Umkristallisierung des Eises in schädigendere Kristallformen kommen soll.

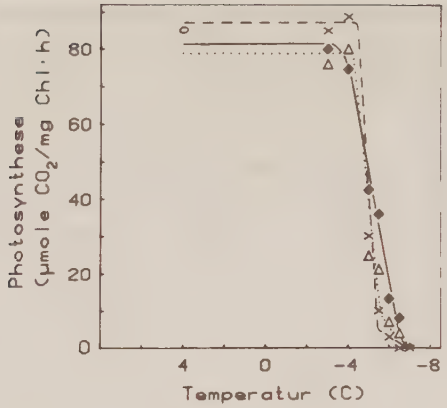

Abb. 10: Einfluß der Geschwindigkeit des Frierens und Auftauens während des Kälteprogramms auf die Inaktivierung der Photosynthese von ungehärteten Spinatblättern.
Die Photosyntheseraten sind als Funktion der Verweiltemperatur aufgetragen. Zu den experimentellen Bedingungen der Messung s. Abb. 1. Kältebehandlung:
Frieren mit 3 C/h, Auftauen mit 3 C/h ——◆—— ;
Frieren mit 12 C/h, Auftauen mit 3 C/h - - -×- - - ;
Frieren mit 3 C/h, Auftauen mit 12 C/h ·····Δ····· .
Die Verweildauer bei der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms betrug immer 4 Stunden.
Die 4C-Kontrolle (O) gilt für alle 3 Meßreihen.
Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Abb. 10 zeigt, daß innerhalb einer Änderungsrate der Temperatur von 3 bis 12 Grad pro Stunde eine Veränderung der Gefrier- oder der Auftaugeschwindigkeit zu keiner Änderung des Schadenverlaufs führt: In allen Fällen ergeben sich für die Inaktivierung der Photosynthese innerhalb der Streuung keine signifikanten Unterschiede für den Temperaturbereich, in dem die Schädigung erfolgt. Ähnliche Ergebnisse erhält man für die Atmung (nicht dargestellt). Da sich die

Verweildauer im kritischen Temperaturbereich in den Untersuchungen von LOVELOCK (1953B) im Bereich von Sekunden bewegen, ist denkbar, daß unter natürlichen Bedingungen mit langsamen Frier- und Auftaugeschwindigkeiten kein Unterschied im Schadensmaß bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Temperaturänderung eintritt.

Zur Feststellung eines möglichen Einflusses der Dauer der Frosteinwirkung auf die Blätter bei der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms, wurde die Verweildauer von 15 Minuten bis 8 Stunden variert. Dabei zeigt sich nur bei einer sehr kurzen Verweildauer (15 Minuten) eine geringgradig schwächere Frostschädigung (Abb. 11), während bei einer Änderung der Verweildauer von 4 auf 8 Stunden keine wesentlichen Unterschiede feststellbar sind. In anderen (nicht dargestellten) Experimenten zeigt sich auch im Bereich zwischen 1 bis 4 Stunden keine Zunahme der Frostschädigung. Daß unterhalb 1 Stunde Verweildauer die Frostschädigung geringer ist, mag daran liegen, daß 15 Minuten nicht ausreichen, um das ganze Blatt auf die erreichte tiefste Temperatur abzukühlen. Auch hier ergaben sich für die Atmung ähnliche Ergebnisse (nicht dargestellt). Dies deckt sich mit den Angaben von LARCHER (1968), daß nach einer Verweildauer von 2 Stunden das Ausmaß der Schädigung von Pflanzenteilen unabhängig von der weiteren Dauer des Verweilens bei der tiefsten Temperatur einer Kältebehandlung unverändert bleibt. Diese Ergebnisse werden auch von SPRAGUE (1955) und MAZUR UND SCHMIDT (1968) bestätigt.

Die experimentellen Bedingungen dieser Experimente liegen nahe bei den Verhältnissen im Rahmen von Gefrier- und Auftauvorgängen in der Natur. Innerhalb dieses Rahmens haben demnach weder die Geschwindigkeiten des Frier- und Auftauvorgangs noch die Dauer

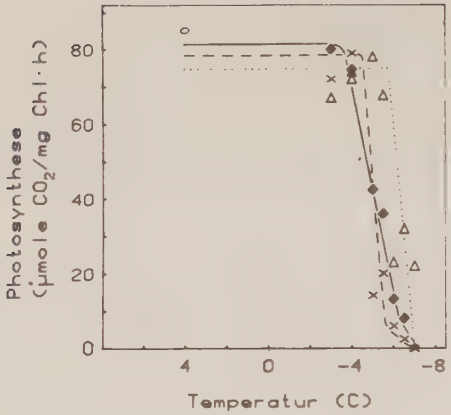

Abb. 11: Einfluß der Verweildauer bei der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms auf die Inaktivierung der Photosynthese von ungehärteten Spinatblättern. Die Photosyntheseraten sind als Funktion der Verweildauer aufgetragen. Zu den experimentellen Bedingungen s. Abb. 1. Kältebehandlung: 4 h Verweildauer bei der tiefsten Temperatur, ——◆—— ; 15 Minuten Verweildauer bei der tiefsten Temperatur, ...Δ..... ; 8 h Verweildauer bei der tiefsten Temperatur – – × – – . In allen Fällen erfolgte das Frieren und Auftauen mit 3 C/h. Die 4C-Kontrolle (O) gilt für alle 3 Meßreihen. Es handelt sich um die Darstellung von repräsentativen Experimenten aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

des gefrorenen Zustandes einen wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der Schädigung. Entscheidend für die Schädigung scheint nur die Minimaltemperatur zu sein, sofern die Verweildauer ausreicht, das Blatt auf diese Temperatur abzukühlen.

5.1.7 Schädigung der Thylakoide durch das Auftauen der Blätter

Die folgenden Experimente sollen zur Klärung der Frage beitragen, ob der Auftauvorgang wesentlich zur Schädigung der Blätter durch die Kältebehandlung beiträgt. Bereits bei Scarth und Levitt (1937) wurde dem Auftauvorgang ein entscheidender schädigender Einfluß beigemessen. In Abb. 12 und 13 werden daher die Raten der photosynthetischen Reaktionen von Thylakoiden, die im gefrorenen Zustand aus kältebehandelten Blättern isoliert wurden, mit den Photosyntheseraten von Blättern der gleichen Proben verglichen, die vor der Messung wieder auf die Ausgangstemperatur aufgetaut worden waren. Als photosynthetische Parameter wurden der nichtzyklische Elektronentransport, die Photophosphorylierung, die H^+-Aufnahme und der lichtinduzierte Δ pH ermittelt.

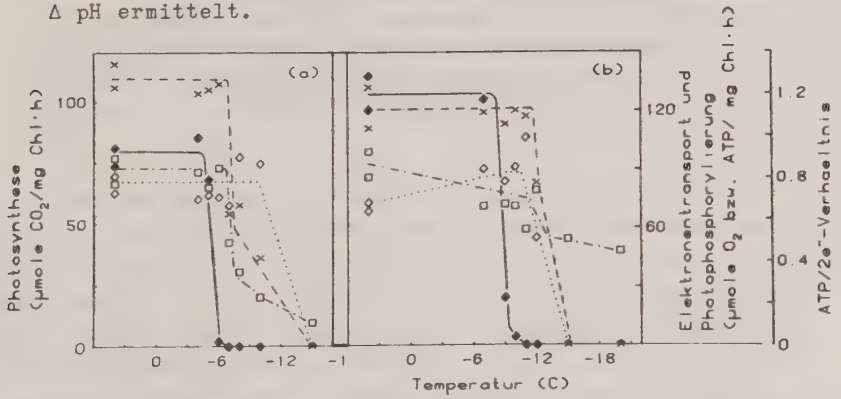

Abb. 12 A, B: Frostinaktivierung des nichtzyklischen Elektronentransports und der Photophosphorylierung von Thylakoiden aus kältebehandelten ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern, die vor dem Auftauen aus Blättern nach 4.1.3.1 isoliert wurden. Auf der Abszisse ist die tiefste erreichte Temperatur des Kälteprogramms angegeben. Die experimentellen Bedingungen entsprechen den Angaben in Abb. 3.

—·—·—□—·—·— nichtzyklischer Elektronentransport,
— — —×— — — Photophosphorylierung, ———◇———
Kopplung: ATP/2e⁻. Zum Vergleich sind die Photosyntheseraten
———◆——— der wieder aufgetauten Blätter aus den gleichen Proben aufgeführt. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 6 (a) bzw. 4 (b) Experimenten.

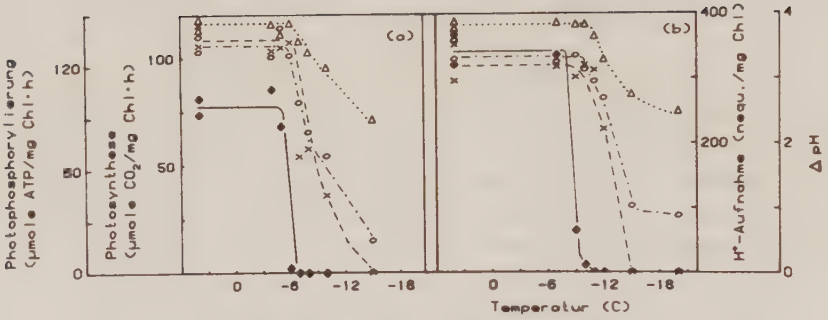

Abb. 13 A, B: Frostinaktivierung der lichtinduzierten H^+-Aufnahme und des Protonengradienten (Δ pH) von Thylakoiden aus kältebehandelten ungehärteten (a) und frostgehärteten (b) Spinatblättern, die vor dem Auftauen aus den Blättern nach 4.1.3.1 isoliert wurden. Auf der Abszisse ist die Verweiltemperatur des Kälteprogramms angegeben. Die experimentellen Bedingungen sind in 4.1.3.6 dargestellt.
—·—o—·— H^+-Aufnahme. ....Δ.... Δ pH. Zum Vergleich sind die Photosyntheseraten ——◆—— und die Photophosphorylierungsraten – – –×– – – der aufgetauten Blätter wie in Abb. 12 angegeben.

Es zeigt sich, daß die Inaktivierung der Thylakoide aus gefrorenen Blättern erst 2 bis 4 Grad tiefer einsetzt als die Inaktivierung der Photosynthese der aufgetauten Blätter. Die Temperaturen, bei denen die photosynthetische CO_2-Assimilation und die photosynthetischen Reaktionen der Thylakoide maximal geschädigt sind, liegen z.T. noch weiter auseinander: Der Bereich der Teilschädigung der Thylakoidreaktion ist - insbesondere bei gehärteten Material - über bis zu 5 Grad gespreitet. Im Gegensatz dazu bricht die CO_2-Assimilation innerhalb von 2 bis 3 Grad zusammen. Das Muster der Schädigung der Thylakoidreaktionen (insbesondere die parallele Schädigung von Elektronentransport und

Photophosphorylierung, s. Abb. 12a) entspricht in den meisten Experimenten dem in Abb. 4 bis 7 dargestellten Verlauf der Frostschädigung der Thylakoide in vivo. In einem kleineren Teil der Experimente wird der Elektronentransport zwar auch geschädigt, das Ausmaß der Schädigung ist jedoch geringer als bei der Photophosphorylierung (s. Abb. 12b). Derartige geringe Schädigung des Elektronentransports wurden bei den Untersuchungen der Frostschädigung der Thylakoide in vivo aber in einigen wenigen Experimenten ebenfalls - wenn auch selten - beobachtet. In den vorhergehenden Abbildungen (Abb. 4 - 7) wurde gezeigt, daß bei kältebehandelten Blättern CO_2-Assimilation und Thylakoidreaktionen nahezu parallel geschädigt werden (s.a. KLOSSON, 1978). Da bei Isolierung der Thylakoide vor dem Auftauen die Schädigung später einsetzt als die Schädigung der CO_2-Assimilation aufgetauter Blätter der gleichen Probe, liegt die Vermutung nahe, daß der Schaden einem wesentlichen Teil erst während des Auftauens gesetzt wird.

5.2 Untersuchungen zur Erholung frostgeschädigter Spinatpflanzen

In der Diplomarbeit (Klosson, 1978) konnte gezeigt werden, daß das einzelne Blatt nicht zur Erholung von Frostschäden befähigt ist. In Abb. 14 ist nun zu sehen, in welchem Umfang sich ganze Spinatpflanzen erholen können, deren Blätter durch Frost geschädigt worden sind.

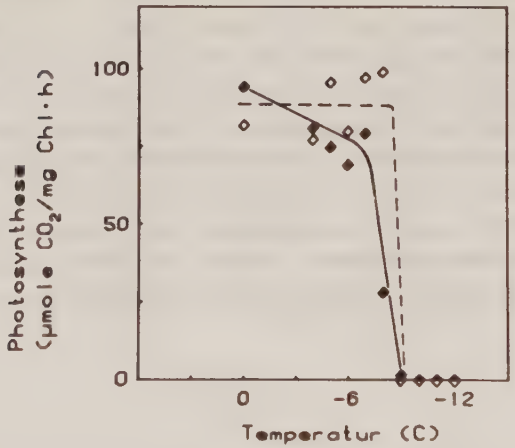

Abb. 14: Vergleich der Photosyntheserate von ungehärteten Spinatblättern im Anschluß sowie zwei Wochen nach einer Kältebehandlung (Aufbewahrung bei Anzuchtbedingungen). Die Kältebehandlung erfolgte durch Frieren ganzer Pflanzen (in Anzuchtkästen), wobei in einer Klimakammer die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 1 C/h abgesenkt wurde. Der Auftauvorgang erfolgte durch Überführen der Pflanzen in eine auf 0 C temperierte Klimakammer. Auf der Abszisse ist die tiefste erreichte Temperatur des Kälteprogramms angegeben. Die experimentellen Bedingungen der Messung entsprechen den in Abb. 1 aufgeführten Angaben. ——◆—— Photosyntheserate sofort nach der Kältebehandlung. — —◇— — — Photosyntheserate zwei Wochen nach der Kältebehandlung.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 3 Experimenten

Die Pflanzen scheinen zur Erholung in der Lage zu sein, wenn ihre Blätter nur teilgeschädigt werden. Allerdings darf die Schädigung nicht zu stark sein. Das deckt sich mit den Beobachtungen von BAUER ET AL. (1969), der an Tannen eine Erholung nur beobachtete, wenn 80% des Assimilationsgewebes noch intakt waren. Bemerkenswert ist noch, daß der Bereich der Teilschädigung der ungehärteten Blätter erst nach -7 C einsetzt. Bei dieser Temperatur wurde in früheren Experimenten oft schon eine vollständige Schädigung gefunden (KLOSSON, 1978; KLOSSON UND KRAUSE, 1981A, s.a. Photosyntheseraten in Abb. 1,2,4,7 in dieser Arbeit). Ob aber Blätter, die sich an der Pflanze befinden, gegenüber einzeln gefrorenen Blättern eine höhere Frostresistenz besitzen, läßt sich nicht sicher sagen, da ein anderes Verfahren der Kältebehandlung als bei den übrigen in dieser Arbeit dargestellten Versuchsserien verwendet wurde. Der Vergleich mit vor dem Frieren gepflückten Blättern des gleichen Experimentes läßt mehr an einen verfahrensbedingten Unterschied denken (nicht dargestellt).

Innerhalb der auf die Kältebehandlung folgenden zwei Wochen wurde beobachtet, daß neue Blätter heranwachsen, die die geschädigten ersetzen (nicht dargestellt). Dabei handelt es sich um junge Blätter bzw. Blatt-Knospen, die nach dem Frieren äußerlich ungeschädigt waren. Zwar ist bekannt, daß einzelne Organe und Gewebe einer Pflanze in der Kälteakklimatisation unterschiedlich weit fortgeschritten sein können (LARCHER, 1981A), aber im Gefriertest mit abgetrennten jungen Blättern war keine erhöhte Frosttoleranz der jungen Blätter im Vergleich zu älteren Blättern feststellbar (KLOSSON, 1978). LARCHER (1969) beobachtete bei Bäumen sogar, daß junge Pflanzenteile äußert kälteempfindlich sind und erst im Laufe der

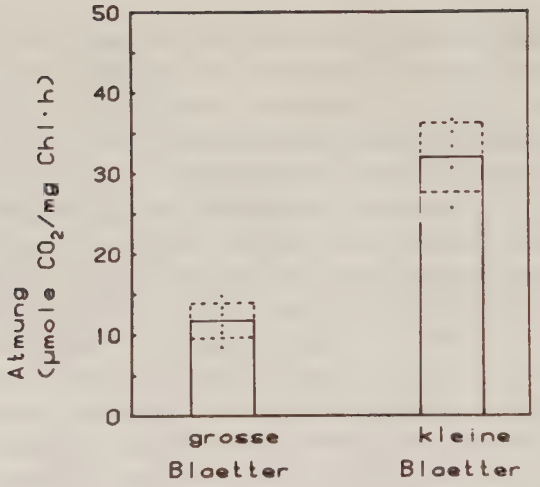

ABB. 15: Atmungsraten junger und ausgewachsener Blätter von ungehärteten Spinatpflanzen. Dargestellt sind die einzelnen Meßwerte (Punkte) sowie die Mittelwerte (durchgezogene Linien) und der Bereich des mittleren Fehlers der Mittelwerte (gestrichelte Linien). Die experimentellen Bedingungen der Messung entsprechen den in Abb. 1 aufgeführten Bedingungen (Preßluft mit 300 µl CO_2/l Luft).
(Blattfläche ausgewachsener Blätter: > 40 cm^2; Blattfläche junger Blätter: < 5 cm^2)

Differenzierung eine Frostresistenz erwerben können. Er nahm an, daß stark wachsende Pflanzenteile besonders kälteempfindlich sind.

Eine mögliche Erklärung für die im Erholungsexperiment beobachtete größere Frostresistenz dieser Blätter gibt Abb. 15: Die Atmungsrate dieser Blättchen ist etwa dreimal so hoch wie bei ausgewachsenen Blättern. Die dabei produzierte Atmungswärme könnte zusammen mit der geschützten Lage der Blättchen in den Knospen für ihre geringere Frostempfindlichkeit verantwortlich sein. Allerdings ist es fraglich, ob bei den tiefen

Temperaturen des Kälteprogramms überhaupt noch eine für diesen Effekt ausreichende Atmungsrate vorhanden ist.

Junge Blätter besitzen eine kleinere Vakuole, in der außerdem auch weniger Schadstoffe angehäuft sind als in ausgewachsenen Blättern. Da SENSER UND BECK (1977) die Hauptursache der Frostschädigung in einer Freisetzung toxischer Vakuoleninhaltsstoffe nach dem Frieren und Auftauen sehen, kann auch eine größere Stabilität dieser Vakuolen (evtl. infolge ihres geringen Gehaltes an Schadstoffen) für die geringere Frostempfindlichkeit der jungen Blätter eine Rolle spielen. In diese Richtung weisen auch Untersuchungen von KAPPEN (1969) an jungen Blättern von Halophyten, die sich als besonders widerstandsfähig gegen tiefe Temperaturen erwiesen haben. Diese Blätter waren wasser-und chlorid-ärmer als ältere Blätter, während der Zuckergehalt doppelt so hoch war. Dabei handelte es sich vermutlich weniger um einen Mechanismus zum Erwerb der Frostresistenz, sondern um den Ausdruck des Reifestadiums. Allerdings bleibt dann ungeklärt, warum die höhere Frosttoleranz nur bei jungen Blättern zu beobachten ist, die noch in Verbindung mit dem Sproß der Pflanze stehen, während gepflückte Blätter diese Frosttoleranz nicht mehr zeigen (KLOSSON, 1978). Dies deutet auf eine noch unbekannte Mitwirkung des Sprosses an dieser gesteigerten Frosttoleranz junger Blättchen hin, der evtl. über den Stoffaustausch beim intakten Verbund erfolgen kann. Derartige Phänomene sind übrigens im Obstbau schon lange bekannt, da Knospen an Sträuchern und Bäumen kälteresistenter sind als die meisten übrigen Pflanzenteile.

Eine weitere Voraussetzung für das Erholungsvermögen ganzer Pflanzen ist nach anderen Beobachtungen die Intaktheit der Wurzeln. Spinatpflanzen in kleinen Blumentöpfen, deren Wurzeln nicht besonders vor der Frosteinwirkung geschützt wurden, gingen nach dem Frieren zugrunde; und zwar sogar nach dem Frieren auf Temperaturen, bei denen die Blätter äußerlich ungeschädigt zu sein schienen (ohne Abbildung). Die Wurzeln sind vermutlich frostempfindlicher als die oberirdischen Pflanzenteile (s.a. LARCHER, 1969). Unter natürlichen Bedingungen werden die Wurzeln aber vor zu starker Frosteinwirkung durch den Boden geschützt. Daß Pflanzen mit voll frostgeschädigten Blättern keine Erholung mehr zeigen, könnte daran liegen, daß bei diesen Temperaturen zum einen auch die kleinen Blättchen oder der Sproß, zum anderen trotz Schutz durch Erde die Wurzeln geschädigt werden.

5.3 Frostschädigung von ausgewählten C3-Pflanzen im Vergleich zu *Spinacia oleracea L.*

In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die beim Spinat gefundenen Mechanismen der Frostschädigung auch für andere Pflanzen gelten.

5.3.1 Untersuchungen an krautigen Pflanzen: *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze, Viola x wittrockiana Gams, Triticum aestivum L.*

Bei den untersuchten Pflanzen handelte es sich bei *Tetragonia* und *Viola* um winterannuelle krautige Dicotyledonen, bei *Triticum* um ein Gras. Im Vergleich zu der ebenfalls winterannuellen Pflanze *Spinacia* erwiesen sich *Tetragonia* als weniger, *Viola* und *Triticum* als mehr frostresistent.

Es erwies sich als schwierig, aus diesen Pflanzen aktive Chloroplasten oder Thylakoide zu isolieren. Die Blattzellen enthalten meist Tannine und Polyphenole, die die biochemischen Reaktionen stören. Deshalb wurden nur Untersuchungen an den Blättern durchgeführt. Es wurden einerseits die Photosynthese- und Atmungsrate, andererseits die physikalischen Parameter Chlorophyll-a-Fluoreszenz, apparente Absorption und Membranpotential-abhängiges Signal bei 535 nm (s. 4.1.2.3 und 4.1.2.4) vor und nach der Kältebehandlung bestimmt.

Das allgemeine Muster der Frostschädigung der Blätter dieser Arten war - bezogen auf die Inaktivierung der photosynthetischen Aktivität - dem bei *Spinacia* beobachteten Muster (s. Klosson: Diplomarbeit, 1978) sehr ähnlich.

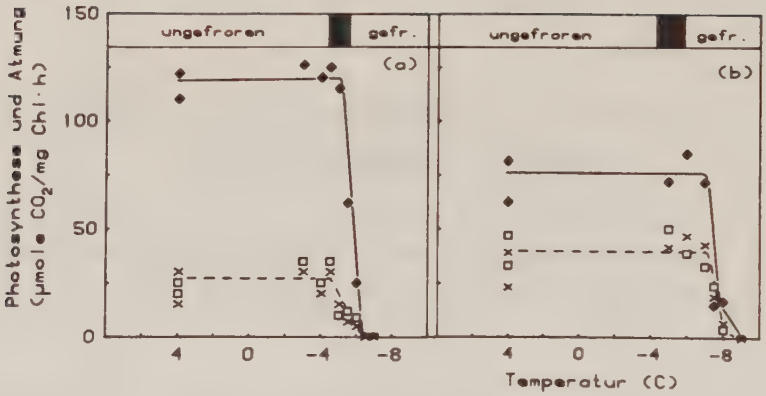

Abb. 16 A, B: Photosynthese und Atmung ungehärteter (a) und gehärteter (b) *Tetragonia*-Blätter nach der Kältebehandlung (s. 4.1.1). Die Raten der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (——◆——) und der respiratorischen CO_2-Entwicklung im Dunkeln in Gegenwart (- - - -□- - - -) wie in Abwesenheit (- - - -×- - - -) von 300 µl CO_2/l Luft sind als Funktion der tiefsten erreichten Temperatur des Kälteprogramms (sog. Verweiltemperatur) aufgetragen. Die Lichtintensität für die Photosynthese betrug 100 W/m^2 (Rotlicht, 80% Lichtsättigung). Da sich die Raten der Atmung in Gegenwart und Abwesenheit von CO_2 nur unwesentlich unterschieden, wurden sie zu einer Kurve zusammengefaßt. Über den Kurven der Photosynthese und Atmung wurde angegeben, bei welchen Temperaturen die sichtbare Eisbildung in den Blättern einsetzt.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 6 (a) bzw. 4 (b) Experimenten.

Tetragonia erwies sich in unseren Untersuchungen als die frostempfindlichste Pflanze. Wie Abb. 16 zeigt, liegt bei ungehärteten Blättern der Bereich der Teilschädigung zwischen -5 und -7 C. Unterhalb -4 C sind die Blätter gefroren. Dies entspricht in etwa den Verhältnissen bei Spinatblättern. Dagegen ist eine Härtung der *Tetragonia*-Blätter nur in bescheidenen Grenzen möglich: Ein Härtungsversuch in der Klimakammer analog zur Härtung des Spinats führte ebenso wie ein Härteversuch im Freiland zum Absterben der Pflanzen. Es gelang nur, in einem ungeheizten Gewächshaus (Temperatur: tags ca +10 C, nachts ca +3 C) im Winter eine minimale Zunahme der Frosttoleranz zu erreichen.

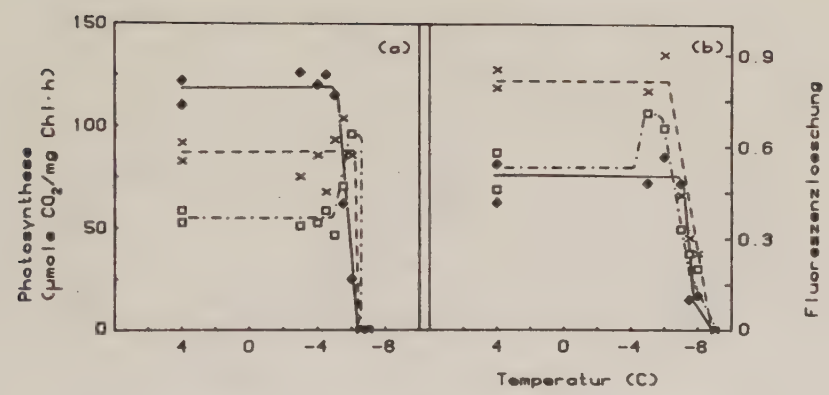

Abb. 17 a, b: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Tetragonia*-Blättern als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms. Die Fluoreszenzsignale wurden nach 3 Minuten Dunkelzeit in Gegenwart (—·—·□—·—·) und Abwesenheit (---×---) von 300 µl CO_2/l Luft und 100 W/m^2 Lichtintensität (Rotlicht, 80% Lichtsättigung der CO_2-Fixierung) bei Raumtemperatur aufgenommen (s. Abb. 16 a, b). Die Löschung ist definiert als (P-S)/S (P, maximale Fluoreszenzemission während der Belichtung; S, stationäre Fluoreszenzemission nach 2 Minuten im Licht). Zum Vergleich ist die Photosynthese (——◆——) angegeben.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 6 (a) bzw. 4 (b) Experimenten.

Bei gehärteten Blättern verschiebt sich der Beginn der Schädigung (Inaktivierung der Photosynthese) auf -6 bis -7 C. Der Temperatur-Bereich, über den sich die Schädigung erstreckt ist von ca 1,5 Gradeinheiten bei ungehärteten Blättern auf etwa 2 bis maximal 2,5 Gradeinheiten vergrößert. Atmung und Photosynthese verhalten sich gleich frostsensibel. Der Beginn der Schädigung scheint in keinem Zusammenhang mit dem Beginn der Eisbildung in den Blättern zu stehen.

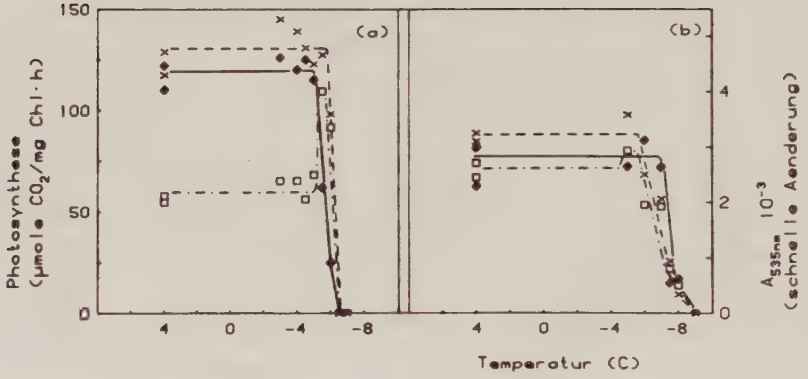

ABB. 18 A, B: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Tetragonia*-Blättern. (Das Maximum dieser Absorptionsänderung liegt bei ca 515 nm). Sie wurde als schneller Anteil der Absorptionsänderung bei 535 nm bestimmt (s. 4.1.2.4), aufgenommen nach 3 Minuten Dunkelphase: 2 Minuten Rotlicht (100 W/m^2, 80% Lichtsättigung der CO_2-Fixierung) beim Ausschalten des Lichtes und aufgetragen als Funktion der tiefsten erreichten Temperatur des Kälteprogramms: —·—□—·— , in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. — — —×— — — , in Abwesenheit von CO_2. ———◆———, Raten der Photosynthese. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 6 (a) bzw. 4 (b) Experimenten.

Wie beim Spinat fand sich bei partiell geschädigten *Tetragonia*-Blättern in den meisten Experimenten eine Stimulation der Chlorophyll-a-Fluoreszenzlöschung, der Absorptions-Änderung bei 535 nm und des Membranpotential-abhängigen Signals in Gegenwart von CO_2 (Abb. 17, 18 und 19; vergl. a. KLOSSON, 1978, sowie KLOSSON UND KRAUSE, 1981B). Wenn eine deutliche Stimulation nicht zu sehen ist (s. Abb. 18 und 19b), kann dies daran liegen, daß sie wegen des engen Temperaturbereichs der Teilschädigung bei *Tetragonia* nicht erfaßt wurde.

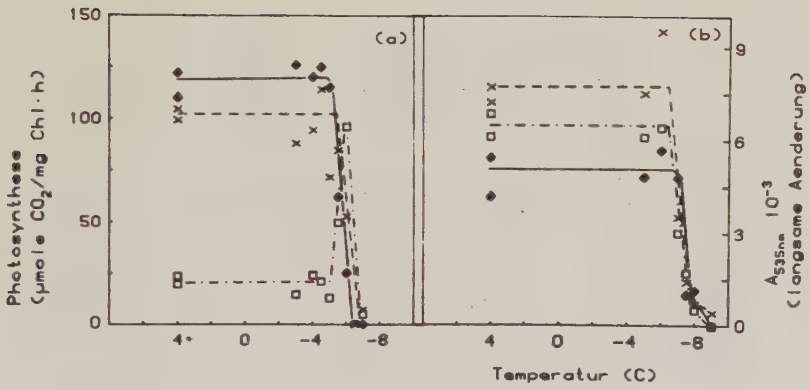

Abb. 19 a, b: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die apparente Absorptionsänderung bei 535 nm von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Tetragonia*-Blättern. Die apparente Absorptionsänderung wurde als langsamer Anteil der Absorptionsänderung bei 535 nm bestimmt; sie wird durch Lichtstreuungsänderungen bedingt (s. 4.1.2.4). Die Signale wurden aufgenommen nach 3 Minuten Dunkelzeit und 2 Minuten Rotlicht (100 W/m^2, 80% Lichtsättigung der CO_2-Fixierung) beim Ausschalten des Lichtes und als Funktion der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms aufgetragen: ·—·—□—·—· , in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. – – –×– – – , in Abwesenheit von CO_2. ——◆—— , Raten der Photosynthese.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von 6 (a) bzw. 4 (b) Experimenten.

Unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen einer Stimulation sind auch bei *Tetragonia* die biophysikalischen Signale etwas weniger frostempfindlich als die Photosynthese. Dies - wie auch die Stimulation der biophysykalischen Parameter - deutet darauf hin, daß wie beim Spinat die energie-konservierenden Thylakoid- Reaktionen nicht der Ort der Primärschädigung durch Frost sind. Darauf wird in der Diskussion (s. 6.) noch ausführlicher eingegangen werden.

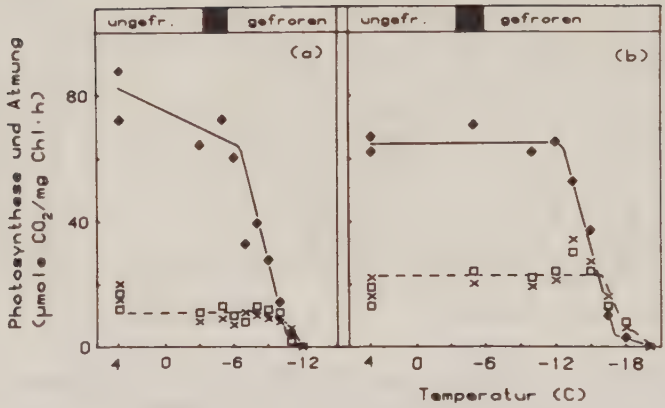

ABB. 20 A, B: Photosynthese und Atmung ungehärteter (a) und frostgehärteter (b) *Viola*-Blätter nach der Kältebehandlung (s. 4.1.1). Die Raten der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (——◆——) und der respiratorischen CO_2-Entwicklung im Dunkeln in Gegenwart (- - -□- - -) wie in Abwesenheit (- - -×- - -) von 300 µl CO_2/l Luft wurden als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen. Die Meßbedingungen und die Art der Darstellung entsprechen den in Abb. 16 aufgeführten Angaben. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 4 Experimenten.

Bei den Darstellungen zur Frostinaktivierung von *Viola* ist besonders deutlich zu sehen, daß die biophysikalischen Signale weniger frostempfindlich sind als die photosynthetische CO_2-Fixierung. Da nach der Theorie (s. 4.1.2.3 und 4.1.2.4) diese Signale weitgehend durch die energiekonservierenden Thylakoidreaktionen verursacht werden, scheint bei *Viola* die CO_2Fixierung im Vergleich zu den Thylakoidreaktionen besonders frostempfindlich zu sein.

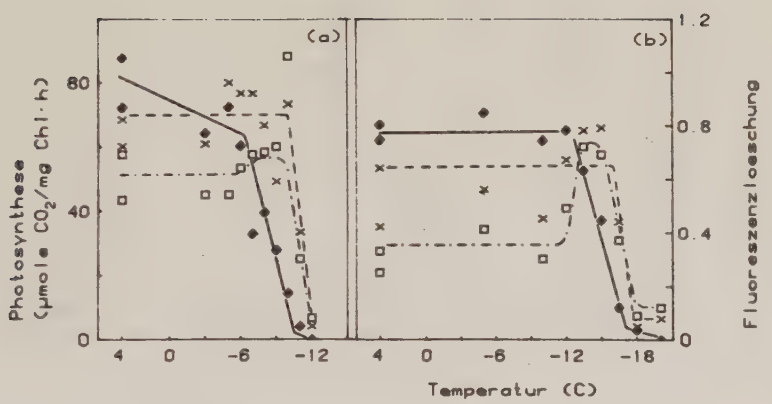

Abb. 21 A, B: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Viola*-Blättern als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms. Die Fluoreszenzsignale wurden nach 3 Minuten Dunkelzeit in Gegenwart (—·—□—·—) und Abwesenheit (— — —×— — —) von 300 µl CO_2/l Luft und 100 W/m^2 Lichtintensität (Rotlicht, 80% Lichtsättigung) aufgenommen. Die Berechnung der Fluoreszenz-Löschung erfolgte wie für Abb. 17. Zum Vergleich ist die Photosynthese (———◆———) angegeben.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 4 Experimenten.

In ca 50% der Experimente sieht man auch in Abwesenheit von CO_2 eine geringe Stimulation des Lichtstreuungssignals mit Beginn der Photosyntheseinaktivierung. Für diesen Effekt haben wir bisher keine eindeutige Erklärung. Beim Membranpotential-abhängigen Signal werden in Gegenwart von CO_2 nur geringe oder gar keine Größenzunahmen der Signale im Bereich der Teilschädigung beobachtet (Abb. 23). Dies kann wieder mit der geringen Signalgröße und dem z.T. geringen Größenunterschied zwischen den Signalen in An- und Abwesenheit von CO_2 erklärt werden. Ein typischer Unterschied im Schadensverlauf zwischen ungehärteten und gehärteten *Viola*-Blättern ist nicht zu ersehen.

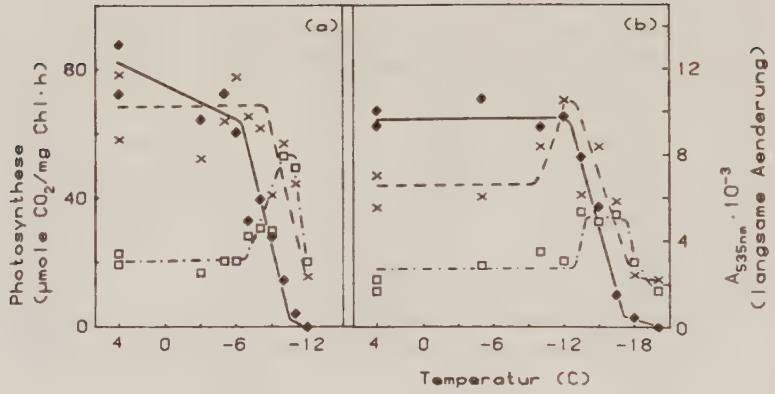

ABB. 22 A, B: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die apparente Absorptionsänderung bei 535 nm von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Viola*-Blättern. Die Absorptionsänderung wurde wie für Abb. 19 bestimmt und als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen: ·-·-□-·-·, in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. - - -×- - -, in Abwesenheit von CO_2. ——◆——, Raten der Photosynthese.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 4 Experimenten.

Ungehärtete Blätter von *Viola x wittrockiana Gams* werden unterhalb -6 C geschädigt. Dabei ist die Atmung weniger frostempfindlich als die Photosynthese (Abb. 20). Eine stärkere Frostresistenz der Atmung wurde in seltenen Fällen auch bei Spinat gesehen, allerdings erheblich weniger stark ausgeprägt. Volle Schädigung wird für ungehärtete Blätter bei etwa -12 C erreicht. Bei gehärtetem Material von *Viola* setzt die Inaktivierung der Photosynthese zwischen -12 und -14 C ein. Die volle Schädigung wird zwischen -18 bis -20 C erreicht. Der Schadensverlauf entspricht dem von ungehärteten Blättern: Die Hemmung der Atmung wird erst sichtbar, wenn die Photosyntheserate bereits unter 50% der Kontrollrate liegt.

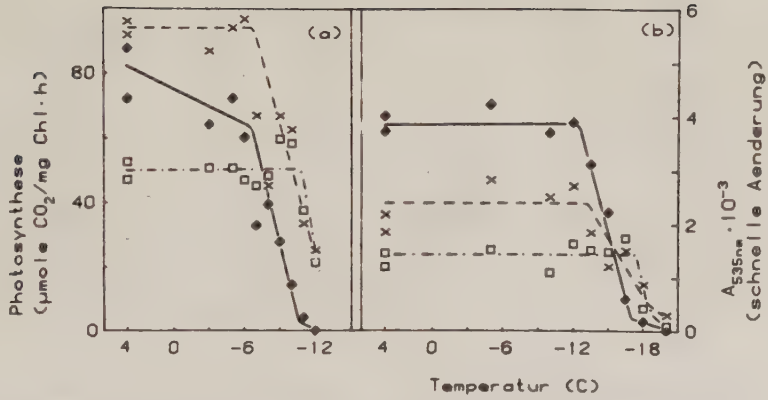

Abb. 23 a, b: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Viola*-Blättern. Die Absorptionsänderung wurde wie für Abb. 18 bestimmt und als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen: —·—□—·—·— , in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. — — —×— — — , in Abwesenheit von CO_2. ——◆—— , Raten der Photosynthese. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 4 Experimenten.

Sowohl bei ungehärteten wie gehärteten Blättern besteht keinerlei Beziehung zwischen dem Beginn der Frostschädigung und dem Beginn der Eisbildung in den Blättern bei -4 C.

Die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz läßt mit Beginn der Frostschädigung eine geringe Stimulation in Gegenwart von CO_2 erkennen, der Effekt ist aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei Spinat. Parallel wird die Fluoreszenzlöschung in Abwesenheit von CO_2 geringer, um bei Vollschädigung ganz zu verschwinden (Abb. 21). Dagegen ist für die Lichtabsorptionsänderung wiederum eine deutliche Stimulation bei teilgeschädigten Blättern im Licht-Dunkel-Wechsel zu erkennen (Abb. 22).

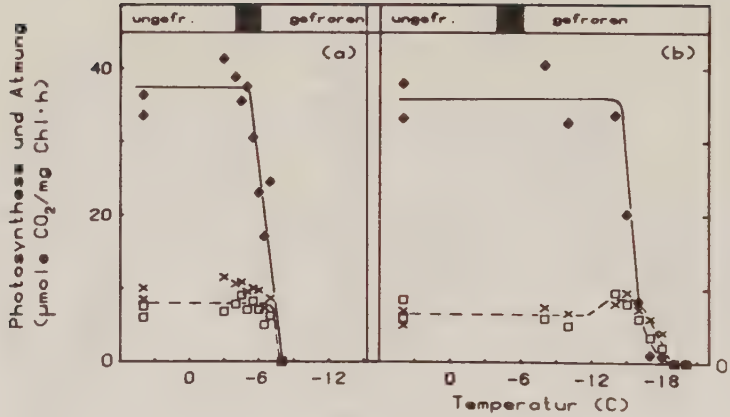

Abb. 24 a, b: Photosynthese und Atmung ungehärteter (a) und gehärteter (b) *Triticum*-Blätter nach der Kältebehandlung (s. 4.1.1). Die Raten der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (——◆——) und der respiratorischen CO_2-Entwicklung im Dunkeln in Gegenwart (- - -□- - -) wie in Abwesenheit (- - -×- - -) von 300 µl CO_2/l Luft sind als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen. Die Lichtintensität für die Photosynthese betrug 45 W/m^2 (Rotlicht, Halbsättigung). Die Art der Darstellung entspricht Abb. 16.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Die Photosynthese ungehärteter Blätter von *Triticum aestivum L.* nach der Kältebehandlung ist ab etwa -5 C gehemmt. Die Vollschädigung wird etwa bei -8 C erreicht (Abb. 24). Die Atmung wird erst etwa 1 Grad tiefer betroffen, erreicht aber ebenfalls bei ca -8 C den Punkt der vollen Hemmung. Bei gehärteten Blättern beginnt die Inaktivierung der Photosynthese bei -12 bis -14 C, bei -18 bis -20 C ist sie vollständig gehemmt. Auch setzt die Hemmung der Atmung bei ca 1 bis 2 Grad tiefer ein, sie ist aber wie die Photosynthese bei -18 bis -20 C vollständig inaktiviert. Bei dieser Temperatur ist das Blatt auch äußerlich vollständig geschädigt. Die Atmung erscheint in einigen Experimenten im Bereich der Teilschädigung geringgradig stimuliert; diese Stimulation liegt aber innerhalb der Streuung.

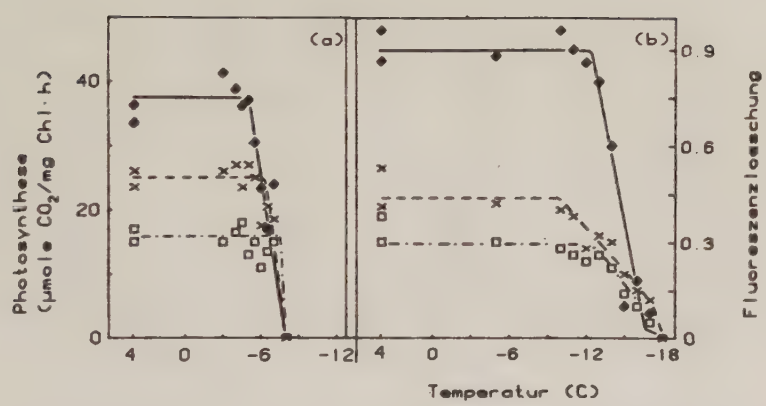

ABB. 25 A, B: **Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Triticum*-Blättern als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms. Die Fluoreszenzsignale wurden nach 3 Minuten Dunkelzeit in Gegenwart (·—·—□—·—·) und Abwesenheit (– – –×– – –) von 300 µl CO_2/l Luft und 45 W/m^2 Lichtintensität (Rotlicht, Halbsättigung) aufgenommen, die Löschung bestimmt wie für Abb. 17. Zum Vergleich ist die Photosynthese (———◆———) angegeben. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.**

Der Beginn der Schädigung erfolgt bei ungehärteten Blättern mit dem Einsetzen der Eisbildung bei -5 bis -6 C, bei gehärteten Blättern besteht kein Zusammenhang zwischen der Frostschädigung und der einsetzenden Eisbildung.

Die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz in An- und Abwesenheit von CO_2 wird bei den Temperaturen, bei denen die Inaktivierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung einsetzt, noch nicht verringert. Eine Stimulation der Signale in Gegenwart von CO_2 wie beim Spinat ist nicht zu sehen. Dennoch ist die CO_2-Fixierung wieder früher als der energiekonservierende Apparat von der Frostschädigung betroffen.

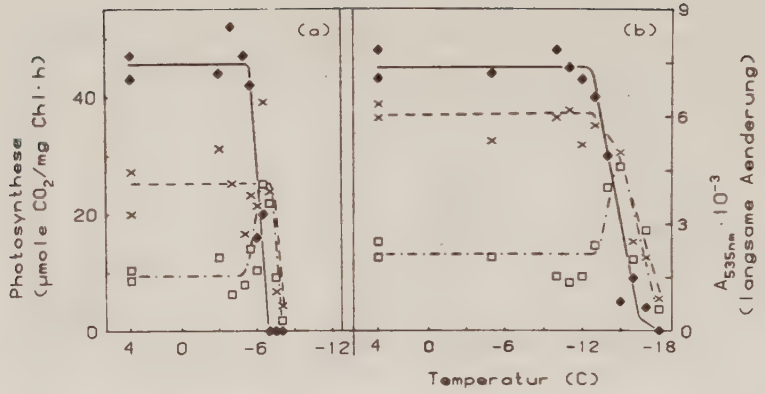

Abb. 26 a, b: Einfluß der Kältebehandlung auf die apparente Absorptionsänderung bei 535 nm von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Triticum*-Blättern. Die Absorptionsänderung wurde bei einer Lichtintensität von 45 W/m^2 (Rotlicht, Halbsättigung) wie für Abb. 19 bestimmt und als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen: -·-□-·-, in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. - - -×- - -, in Abwesenheit von CO_2. ———◆———, Raten der Photosynthese.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Bei der apparenten Lichtabsorptionsänderung bei 535 nm kommt es im Bereich der Teilschädigung der Photosynthese zu einer Stimulation. In drei von sechs Experimenten tritt diese Stimulation sowohl in An- wie in Abwesenheit von CO_2 auf (nicht dargestellt). In der anderen Hälfte bleibt die Stimulierung auf die Signale in Anwesenheit von CO_2 begrenzt (Abb. 26). Die Signale des Membranpotential-abhängigen Signals (Abb. 27) zeigen ein ähnliches Bild wie die Signale der Chlorophyllfluoreszenz: In Abwesenheit von CO_2 brechen sie parallel mit der Photosynthese zusammen, während die Signale in Anwesenheit von CO_2 diesem Zusammenbruch entweder verzögert folgen oder eine geringe Stimulation vor dem Zusammenbruch aufweisen.

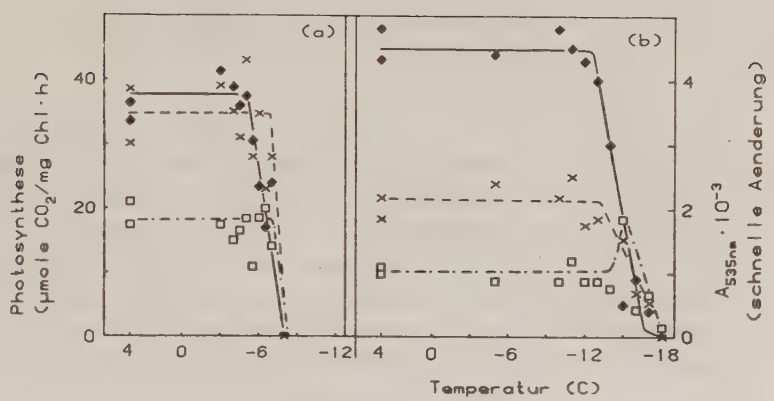

Abb. 27 a, b: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4 .1.1) auf die Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung bei 515 nm von ungehärteten (a) und gehärteten (b) *Triticum*-Blättern. Die Absorptionsänderung wurde bei einer Lichtintensität von 45 W/m^2 (Rotlicht, Halbsättigung) wie für Abb. 18 bestimmt und als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen: —·—□—·— , in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Luft. – – –×– – – , in Abwesenheit von CO_2. ——◆—— , Raten der Photosynthese Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Bei allen drei Pflanzen *(Tetragonia, Viola* und *Triticum)* waren die Blätter bei Eintritt der Vollschädigung (keine nachweisbare Photosynthese) vollinfiltriert. Mit Ausnahme der unterschiedlichen Frosttoleranz und dem größeren Temperaturbereich, über den die Schädigung erfolgte, gab es bei *Viola*, *Tetragonia* und *Triticum* keine Unterschiede zwischen gehärteten und ungehärteten Blättern. Bei *Viola* konnte gezeigt werden, daß einzelne teilgeschädigte Blätter nicht zur Erholung befähigt sind (ohne Abbildung): Bei Zimmertemperatur vertrockneten die geschädigten Blattteile innerhalb von 24 Stunden, und die Photosyntheseleistung der nichtvertrockneten Blatteile wurden ebenfalls verringert. Bei +4 C blieb das Ausmaß des Schadens für einige Tage konstant.

5.3.2 Untersuchungen an einer immergrünen holzigen Pflanze *Hedera helix L.*

Von *Hedera* wurden nur im Freiland gehärtete Blätter untersucht. Das immergrüne Holzgewächs verhält sich etwas anders als die krautigen Pflanzen, die Photosyntheseraten liegen nur geringfügig über den Atmungsraten. Ähnlich erniedrigte Photosyntheseraten sind auch von gehärteten Tannennadeln bekannt (Senser und Beck, 1977). Auch die Atmungsrate ist im Vergleich zu den krautigen Pflanzen vermindert, ein CO_2-Effekt auf die physikalischen Parameter wurde nicht beobachtet.

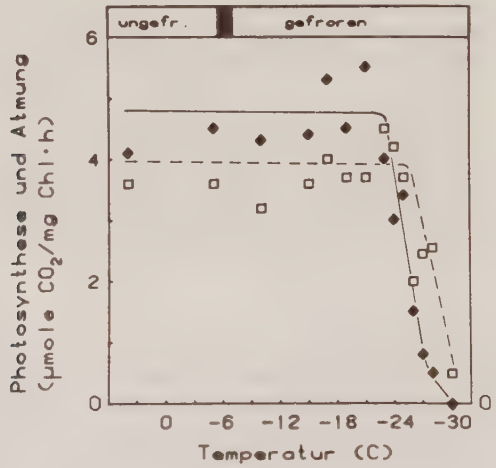

Abb. 28: Photosynthese und Atmung Freiland-gehärteter *Hedera*-Blätter nach der Kältebehandlung (s. 4.1.1). Die Raten der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (——◆——) und der respiratorischen CO_2-Entwicklung im Dunkeln in Gegenwart (- - -□- - -) von 300 µl CO_2/l Luft wurden als Funktion der Verweiltemperatur des Kälteprogramms aufgetragen. Die Lichtintensität für die Photosynthese betrug 45 W/m^2 (Rotlicht, 75% Lichtsättigung der CO_2-Fixierung). Die Art der Darstellung entspricht Abb. 16. Für jede Verweiltemperatur wurden 2 Blätter der Probe ausgewählt und gemessen und in der Darstellung der Mittelwert dieser beiden Messungen wiedergegeben. Dargestellt ist eines von 2 Experimenten.

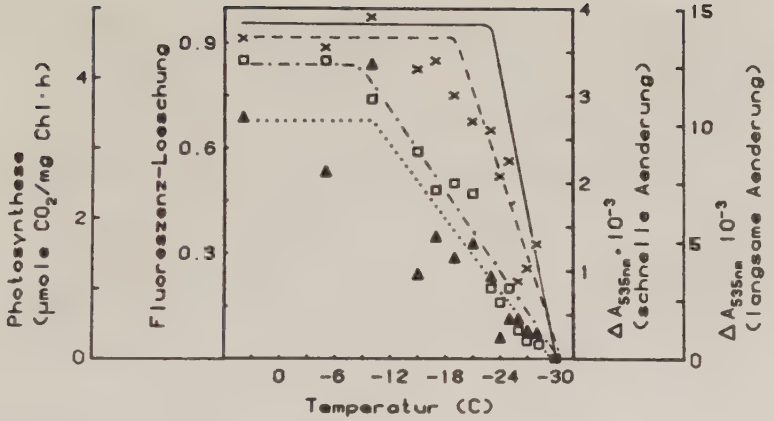

Abb. 29: Einfluß der Kältebehandlung (s. 4.1.1) auf die Löschung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz (·—·—·□—·—·—), die apparente Absorptionsänderung (·····▲·····) und die Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung (— — —×— — —) bei 535 nm von Freiland- gehärteten *Hedera*-Blättern. Die experimentellen Daten entsprechen denen von Abb. 16 - 19, die Messungen erfolgten aber nur in Anwesenheit von CO_2 im Luftstrom. Zum Vergleich ist der Verlauf der Photosynthese in Gegenwart von 300 µl CO_2/l Preßluft (———————— , zu den einzelnen Meßwerten s. Abb.28) mit aufgeführt. Wie in Abb. 28 handelt es sich immer um Mittelwerte aus den Messungen von je 2 Blättern. Dargestellt ist eines von 2 Experimenten.

Im Freiland frostgehärtete Blätter von *Hedera* zeigen eine Frosttoleranz der Photosynthese bis etwa -18 bis -20 C, die volle Schädigung wird etwa zwischen -26 und -30 C erreicht (Abb. 28). Die Photosynthese wird von der Frostschädigung bereits bei erheblich höheren Temperaturen betroffen als die Atmung. Die Hemmung der Atmung beginnt etwa bei -26 C. Nach Frost bis -30 C sind Photosynthese und Atmung nahezu vollständig gehemmt, die Blätter sind dann voll infiltriert. Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Einsetzen der Frostschädigung und dem Einsetzen der Eisbildung in den Blättern bei etwa -6 C.

Die Größe der physikalischen Signale (Abb. 29), die die Energiekonservierung wiedergeben, nimmt über einen großen Temperaturbereich schon vor der Photosyntheserate ab. Eine Stimulation der Signalgröße in Gegenwart von CO_2 findet nicht statt. Damit unterscheidet sich *Hedera* in seinem Schadmuster von den übrigen untersuchten Pflanzen. Auf diese Unterschiede wird in der Diskussion (s. 6.) näher eingegangen. Eine Erholung geschädigter *Hedera*-Blätter konnte nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

5.3.3 Vergleich der Frostschädigung und Frosthärtung von *Spinacia oleracea L.*, *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze*, *Viola x wittrockiana Gams*, *Tritium aestivum L.* und *Hedera helix L.*

Die Unterschiede in der Frostschädigung und in der Frosthärtung sind in Tab.I gegenübergestellt. Als Maß für die Frostschädigung wurde die Temperatur des Beginns der Inaktivierung der Photosynthese gewählt.

Tab. I: Frosthärtung und Frostschädigung höherer Pflanzen

Pflanzenart	Eisbildung	Schadbereich für ungehärtete Blätter*	Schadbereich für gehärtete Blätter*	Härtungsbereich**
Spinacia oleracea L.	- 4 C bis - 5 C	2 Gradeinheiten: - 5 C bis - 8 C	3 Gradeinheiten: - 10 bis - 14 C	5 Gradeinheiten
Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze	- 4 C	1,5 Gradeinheiten: - 4 C bis - 7 C	2,5 Gradeinheiten: - 5 C bis - 8 C	1 Gradeinheit
Viola x wittrockiana Gams	- 4 C	5 Gradeinheiten - 6 C bis - 12 C	6 Gradeinheiten - 12 C bis - 22 C	6 Gradeinheiten
Hedera helix L.	- 6 C	---	8 Gradeinheiten: - 18 C bis - 30 C	---
Triticum aestivum L.	- 5 C bis - 6 C	3 Gradeinheiten: - 5 C bis - 8 C	6 Gradeinheiten: - 12 C bis - 20 C	8 Gradeinheiten

*: Die Unterschiede zwischen den Gradeinheiten und den angegebenen Temperaturen des Schadbereichs erklären sich dadurch, daß die Gradeinheiten die übliche Breite des Schadbereichs vom Beginn der Schädigung bis zur Vollschädigung darstellen, während die Temperaturangaben die höchsten beobachteten Temperaturen zu Beginn der Schädigung sowie die tiefsten beobachteten Temperaturen der Vollschädigung wiedergeben.

**: Der Härtungsbereich ist definiert als der Abstand der Temperaturen, bei denen bei ungehärteten und gehärteten Blättern die Schädigung einsetzte.

Tab.I zeigt, daß die Eisbildung bei allen Pflanzen im gleichen Temperaturbereich einsetzt und der Beginn der Eisbildung meist keinen erkennbaren Bezug zum Beginn der Frostschädigung hat. Die Temperaturen der Eisbildung liegen auch in dem Temperaturbereich (-4 bis -14 C), den LARCHER (1981B) für verschiedene Pflanzen als Temperaturbereich der Eisbildung angibt. Mit zunehmender Frosttoleranz wird in der Regel auch die Breite der Schadbereiche größer.

Daß die CO_2-Fixierung am empfindlichsten auf Frost reagiert, zeigt ein Vergleich der T_{50}-Werte (die Temperaturen, bei denen noch 50% der Kontrollrate vorhanden sind) für die einzelnen Meßparameter. Die T_{50}-Werte der folgenden Tabellen wurden aus Abbildungen aller durchgeführten Experimente ermittelt und Mittelwerte gebildet.

TAB. II: T_{50}-WERTE DER PHOTOSYNTESE, DER ATMUNG, DER FLUORESZENZLÖSCHUNG DER APPARENTEN ABSORPTIONSÄNDERUNG BEI 535 NM, UND DER MEMBRANPOTENTIAL-ABHÄNGIGEN ABSORPTIONSÄNDERUNG BEI *Spinacia oleracea L.*(●)

Parameter	ungehärteter Spinat	gehärteter Spinat
Photosynthese	- 6,8 ± 0,2 C	- 10,9 ± 0,7 C
Atmung	- 7,2 ± 0,3 C	- 11,7 ± 0,8 C
Fluoreszenzlöschung	- 7,0 ± 0,2 C	- 11,4 ± 1,0 C
apparente Absorptionsänderung bei Anschalten des Lichts	- 6,8 ± 0,3 C	- 11,3 ± 1,1 C
apparente Absorptionsänderung bei Ausschalten des Lichts	- 6,9 ± 0,3 C	- 11,2 ± 0,9 C
membranpotential-abhängige Absorptionsänderung	- 7,4 ± 0,2 C	- 11,7 ± 0,9 C

●: Es handelt sich um Mittelwerte aus zehn (ungehärteter Spinat) bzw. fünf Experimenten (gehärteter Spinat). Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Die Signale der Fluoreszenzlöschung und der Absorptionsänderung wurden in Abwesenheit von CO_2 aufgenommen. Zu den weiteren experimentellen Bedingungen siehe Methoden.

Tab. III: T_{50}-Werte der Photosynthese, der Atmung, des nichtzyklischen Elektronentransports, der Photophosphorylierung, der Kopplung, der H^+-Aufnahme und des ΔpH bei *Spinacia oleracea L.* (•)

Parameter	ungehärteter Spinat	gehärteter Spinat
Photosynthese	- 6,2 ± 0,3 C	- 11,2 ± 0,3 C
Atmung	- 6,6 ± 0,4 C	- 11,7 ± 0,7 C
Elektronentransport	- 6,8 ± 0,3 C	- 12,0 ± 0,3 C
Photophosphorylierung	- 6,6 ± 0,3 C	- 11,8 ± 0,4 C
Kopplung ($ATP/2e^-$)	- 7,2 ± 0,3 C	- 12,3 ± 0,5 C
H^+-Aufnahme	- 6,5 ± 0,6 C	- 12,6 ± 0,9 C
Δ pH	- 7,4 ± 0,5 C	- 14,5 ± 0,9 C

•: Es handelt sich um Mittelwerte aus neun (ungehärteter Spinat) bzw. sieben Experimenten (gehärteter Spinat). Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

Tab. IV: T_{50}-Werte der Photosynthese, der Atmung, der Fluoreszenzlöschung, der apparenten Absorptionsänderung bei 535 nm und der membranpotential-abhängigen Absorptionsänderung für *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze.* (•)

Parameter	ungehärtete Blätter	gehärtete Blätter
Photosynthese	- 6,0 ± 0,1 C	- 6,7 ± 0,6 C
Atmung	- 6,2 ± 0,2 C	- 6,9 ± 0,6 C
Fluoreszenzlöschung	- 6,5 ± 0,1 C	- 6,8 ± 0,6 C
apparente Absorptionsänderung bei Anschalten des Lichtes	- 6,4 ± 0,2 C	- 6,9 ± 0,4 C
apparente Absorptionsänderung bei Ausschalten des Lichtes	- 6,4 ± 0,3 C	- 6,6 ± 0,4 C
membranpotentional-abhängige Absorptionsänderung	- 6,4 ± 0,1 C	- 6,6 ± 0,5 C

•: Es handelt sich um Mittelwerte aus sechs (ungehärtete Blätter) bzw. vier Experimenten (gehärtete Blätter). Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Zu den experimentellen Bedingungen siehe Tabelle II.

TAB. V: T_{50}-WERTE DER PHOTOSYNTHESE, DER ATMUNG, DER FLUORESZENZLÖSCHUNG DER APPARENTEN ABSORPTIONSÄNDERUNG BEI 535 NM UND DER MEMBRANPOTENTIAL-ABHÄNGIGEN ABSORPTIONSÄNDERUNG FÜR *Viola x wittrockiana Gams.* (•)

Parameter	ungehärtete Blätter	gehärtete Blätter
Photosynthese	- 6,4 ± 0,7 C	- 15,6 ± 0,5 C
Atmung	- 7,7 ± 1,0 C	- 18,7 ± 1,3 C
Fluoreszenzlöschung	- 8,0 ± 1,1 C	- 19,7 ± 1,6 C
apparente Absorptionsänderung bei Anschalten des Lichtes	- 8,4 ± 1,3 C	- 20,7 ± 2,0 C
apparente Absorptionsänderung bei Ausschalten des Lichtes	- 8,2 ± 1,5 C	- 19,1 ± 1,1 C
membranpotential-abhängige Absorptionsänderung	- 7,6 ± 1,3 C	- 18,5 ± 0,9 C

• : Es handelt sich um Mittelwerte aus vier Experimenten. Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Zu den experimentellen Bedingungen siehe Tabelle II.

TAB. VI. T_{50}-WERTE DER PHOTOSYNTHESE, DER ATMUNG, DER FLUORESZENZLÖSCHUNG, DER APPARENTEN ABSORPTIONSÄNDERUNG BEI 535 NM UND DER MEMBRANPOTENTIAL-ABHÄNGIGEN ABSORPTIONSÄNDERUNG FÜR *Triticum aestivum L.* (•)

Parameter	ungehärtete Blätter	gehärtete Blätter
Photosynthese	- 6,7 ± 0,3 C	- 14,2 ± 0,6 C
Atmung	- 7,2 ± 0,3 C	- 17,3 ± 0,6 C
Fluoreszenzlöschung	- 6,8 ± 0,4 C	- 16,0 ± 0,5 C
apparente Absorptionsänderung bei Anschalten des Lichtes	- 7,2 ± 0,2 C	- 17,6 ± 0,2 C
apparente Absorptionsänderung bei Ausschalten des Lichtes	- 7,2 ± 0,2 C	- 16,5 ± 0,2 C
membranpotential-abhängige Absorptionsänderung	- 7,0 ± 0,2 C	- 15,3 ± 0,4 C

•: Es handelt sich um Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten. Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Zu den experimentellen Bedingungen siehe Tabelle II.

Tab. VII: T_{50}-Werte der Photosynthese, der Atmung, der Fluoreszenzlöschung, der apparenten Absorptionsänderung bei 535 nm und der membranpotential-abhängigen Absorptionsänderung für Freiland-gehärteten *Hedera helix L.* (•)

Parameter	gehärtete Blätter
Photosynthese	- 23,5 ± 1,6 C
Atmung	- 26,3 ± 1,4 C
Fluoreszenzlöschung	- 23,3 ± 0,5 C
apparente Absorptionsänderung bei Anschalten des Lichtes	- 23,1 ± 0,7 C
apparente Absorptionsänderung bei Ausschalten des Lichtes	- 20,5 ± 2,9 C
membranpotential-abhängige Absorptionsänderung	- 23,7 ± 0,8 C

•: Es handelt sich um Mittelwerte aus zwei Experimenten. Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Die Signale der Fluoreszenzlöschung und der Absorptionsänderung wurden in Gegenwart von CO_2 aufgenommen. Zu den weiteren experimentellen Bedingungen siehe Methoden.

Mit Ausnahme von *Hedera* und *Tetragonia* zeigt sich bei den gehärteten Blättern eine deutliche Verzögerung des Zusammenbruchs der physikalischen Signale und der Atmung gegenüber der photosynthetischen CO_2-Aufnahme (s. Tab.II bis Tab.VII). Die Unterschiede bei ungehärteten Blättern sind dagegen sehr klein und liegen mit Ausnahme von *Viola* im Bereich der Streuung. Diese Befunde decken sich aber z.T. mit schon lange bekannten Beobachtungen von Ullrich (1962), wo die Photosynthese ebenfalls empfindlicher als die Atmung erschien. Auch sollen nach seinen Mitteilungen die "Atmungsenzyme" in vitro frostabiler sein als die Enzyme der photosynthetischen Reaktionen. Wie Tab.III zeigt, entspricht der Verzögerung der Erniedrigung der biophysikalischen Signale bei Spinatblättern auch eine Verzögerung der Hemmung der photosynthetischen Reaktionen der Thylakoide. Dabei werden innerhalb der Thylakoide die Kopplung und der Δ pH erst bei noch tieferen Temperaturen als die übrigen Reaktionen von der Frostschädigung betroffen.

5.4. Frostschädigung von isolierten Thylakoiden in Gegenwart von Salzionen

Die Schädigung von Thylakoiden durch Frieren in Gegenwart von Salzionen ist bereits in zahlreichen Veröffentlichungen früherer Jahre beschrieben worden (Heber und Santarius, 1964; Santarius, 1969; Santarius und Heber, 1970; Heber, 1967; Jensen, 1981). In den folgenden In-Vitro-Experimenten wird die Fragestellung untersucht, ob der durch die Entwässerung während des Frierens stattfindende Konzentrationsanstieg der Salzionen Ursache der in vivo beobachteten Frostschädigung von Blättern sein kann.

Bei den früheren Untersuchungen (s. o.) wurden andere Verfahren zur Kältebehandlung der Thylakoide verwendet und z.T. andere Parameter gemessen als bei den bisher veröffentlichten In-Vivo-Experimenten (Klosson, 1978; Klosson und Krause, 1981a). Ferner ist der Umfang der hier untersuchten photosynthetischen Parameter umfaßender als bei den früheren Untersuchungen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der In-Vitro-Frostschädigungen mit den bei Klosson (1978) und unter 5.1 dargestellten Frostschädigungen in vivo zu gewährleisten, wurde daher die Wirkung von Salzionen (NaCl und $MgCl_2$) auf Thylakoidmembranen beim Frieren in vitro unter geänderten Bedingungen neu untersucht.

5.4.1 Wirkung von NaCl

Thylakoide in 50 mM NaCl wurden bei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen auf -10 C (Abb. 30), oder in Gegenwart einer konstanten Saccharosekonzentration auf verschiedene Temperaturen abgekühlt (Abb. 31).

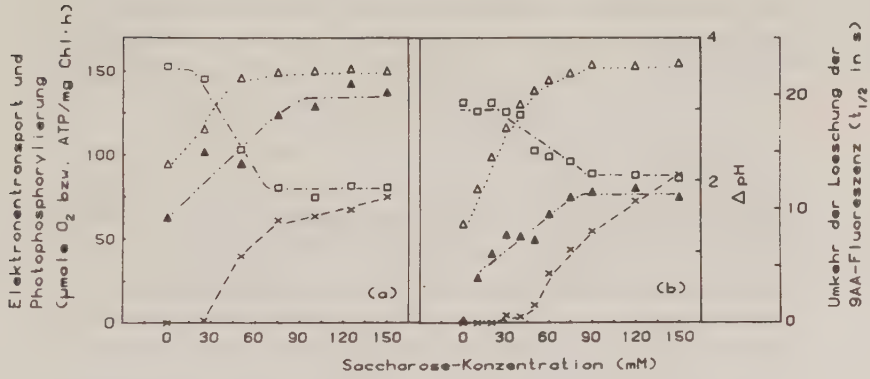

Abb. 30: Einfluß des Frierens auf die photosynthetischen Aktivitäten von Thylakoiden, die in Gegenwart von 50 mM NaCl und einer steigenden Saccharosekonzentration auf -10 C gefroren wurden (Kälteprogramm: Frieren mit 6 C/h, 1 h Verweildauer bei -10 C, Auftauen mit 6 C/h). Auf der Abszisse ist die Saccharosekonzentration angegeben. Die Thylakoide stammten aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern (NaCl-Isolierung nach Santarius und Ernst, s. 4.2.1.1). —·—□—·— nichtzyklischer Elektronentransport (Sauerstoffentwicklung mit 1 mM K_3 $(Fe(CN)_6)$ als Elektronenakzeptor in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 1,5 mM ADP).
— — —×— — — Photophosphorylierung (enzymatische Bestimmung).
·····△····· Δ pH (bestimmt nach 4.1.3.6 aus der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz).
—··—▲··— Halbwertzeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz nach Ausschalten des Rotlichtes.
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Mit fallender Saccharosekonzentration kommt es in Gegenwart von 50 mM NaCl ab 100 mM bis 70 mM Saccharose zu einer zunehmenden Entkopplung der Photophosphorylierung vom nichtzyklischen Elektronentransport, erkennbar an der zunehmenden Inaktivierung der Photophosphorylierung, der Abnahme des Δ pH und der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals (Abb. 30). Dabei fällt auf, daß die Photophosphorylierungsraten schon abnehmen, wenn die übrigen Parameter noch weitgehend unverändert sind. Zwischen Thylakoiden aus ungehärteten und gehärteten Blättern besteht kein wesentlicher Unterschied in der Frostempfindlichkeit.

Beim Frieren der Thylakoide in Gegenwart von 50 mM NaCl und 50 mM Saccharose auf verschiedene Temperaturen zeigt sich in Abb. 31, daß die Photophosphorylierung bereits ab -3 C zunehmend inaktiviert wird, während eine starke Stimulation des nichtzyklischen Elektronentransports erst bei erheblich tieferen Temperaren sichtbar wird. Das Maximum der Schädigung wird bei -12 C erreicht. Ein Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen Thylakoiden aus ungehärteten und gehärteten Blättern war nicht feststellbar. In allen Ansätzen erfolgte die spontane Eisbildung bei etwa -3 C.

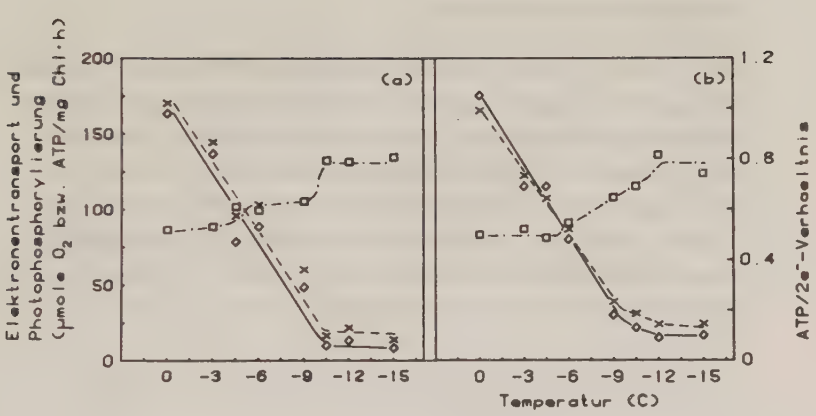

ABB. 31: Einfluß des Frierens auf die photosynthetischen Aktivitäten von Thylakoiden, die in Gegenwart von 50 mM NaCl und 50 mM Saccharose auf die in der Abszisse angegeben Temperaturen gefroren wurden. Die Thylakoide stammten aus ungehärteten (a) und frostgehärteten (b) Spinatblättern (NaCl-Isolierung nach SANTARIUS UND ERNST, S. 4.2.1.1). Die experimentellen Bedingungen entsprechen den in Abb. 30 aufgeführten Angaben.
—·—·□—·—· nichtzyklischer Elektronentransport.
— — —×— — — Photophosphorylierung. ——◇—— Kopplung (ATP/2e⁻).
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

5.4.2 Wirkung von $MgCl_2$

$MgCl_2$ wird in der Literatur (Heber et al. 1979a) als stärker frostschädigend als NaCl beschrieben. Durch Salzionen während des Frierens verursachte Schädigungen sollten daher deutlicher zu sehen sein. Mg^{2+}-Ionen sind in Zellen in erheblichen Mengen vorhanden, da sie als Enzymaktivatoren, zur Chelatbildung der Adeninnukleotide etc. und zur Stabilisierung der Membranen benötigt werden.

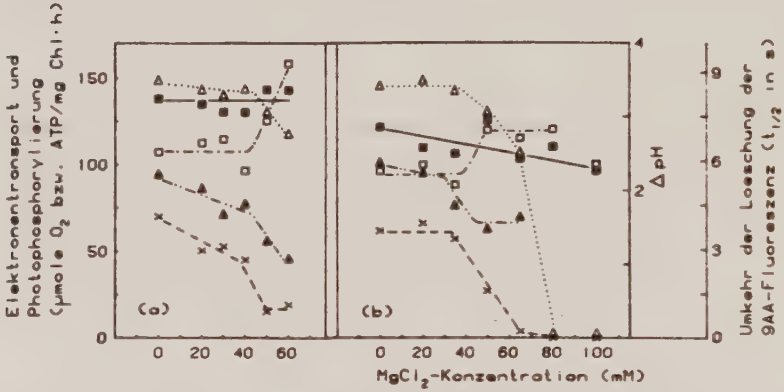

Abb. 32: Photosynthetische Aktivitäten von Thylakoiden, die in gegenwart von 100 mM Saccharose und verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen auf -20 C gefroren wurden. (Kälteprogramm: Frieren mit 18 C/h). Die Thylakoide stammten aus ungehärteten (a) und frostgehärteten (b) Spinatblättern (NaCl-Isolierung nach Santarius und Ernst. s.4.2.1.1). Auf der Abszisse ist die $MgCl_2$-Konzentration angegeben. ·—·—□·—·—nichtzyklischer Elektronentransport (Sauerstoffentwicklung mit 1 mM K_3 $(Fe(CN)_6)$ als Elektronenakzeptor in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 1,5 mM (ADP). —— —×— —— Photophosphorylierung (enzymatische Bestimmung). ———■——— entkoppelter Elektronentransport (Sauerstoffentwicklung mit 1 mM K_3 $(Fe(CN)_6)$ als Elektronenakzeptor in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 5mM NH_4Cl). ·····Δ····· Δ pH (bestimmt nach 4.1.3.6 aus der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz). —··—▲··—·· Halbwertzeit der Umkehr der lichtinduzierten 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung nach Ausschalten des Rotlichts.
Es handelt sich um repräsentative Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Die ähnlich wie bei HEBER ET AL. (1979A) in Gegenwart von 100 mM Saccharose gegen eine steigende $MgCl_2$-Konzentration auf -20 C gefrorenen Thylakoide zeigen in Abb. 32 eine Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals bereits bei Konzentrationen unterhalb 40 mM $MgCl_2$, eine bei höheren Konzentrationen einsetzende Abnahme des Δ pH und eine Stimulierung des gekoppelten nichtzyklischen Elektronentransports ab ca 50 mM $MgCl_2$, verbunden mit einem starken Abfall der Photophosphorylierungsraten. Diese Entkopplung ist besonders deutlich in Abb. 32a zu sehen. Der mit NH_4Cl entkoppelte Elektronentransport bleibt bei diesen $MgCl_2$-Konzentrationen im wesentlichen unbeeinflußt. Ähnliche Ergebnisse zeigt das Experiment mit Thylakoiden aus gehärteten Blättern, obwohl hier noch höhere Ausgangskonzentrationen für $MgCl_2$ eingesetzt wurden. Wenn auch die Meßwerte relativ stark streuen, so ist doch deutlich zu sehen, daß in Gegenwart von $MgCl_2$ bis zu Ausgangskonzentrationen von 60 bzw. 100 mM nur entkoppelnde Effekte (s. Photophosphorylierung und Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals), aber keine deutliche Hemmung des Elektronentransports zu erzielen sind.

Daß der gekoppelte Elektronentransport nach seiner frostbedingten Entkopplung z.T. etwas höhere Werte erreicht als der mit NH_4Cl entkoppelte Elektronentransport mag Folge einer geringgradigen Hemmung des Elektronentransports durch NH_4Cl sein, wie sie von IZAWA UND GOOD beschrieben wird (1972).

Bei den In-Vivo-Experimenten (s. 5.1.3) wurden nichtzyklischer Elektronentransport und Photophosphorylierung gleichmäßig gehemmt, während bei In-Vitro-Experimenten mit NaCl und $MgCl_2$ die Hemmung des Elektronentransports unterbleibt, und nur eine Entkopplung

eintritt. Obwohl $MgCl_2$ stärker membrantoxisch wirkt als NaCl, wird auch in Gegenwart höher $MgCl_2$-Konzentrationen der Elektronentransport nur wenig von der Frosteinwirkung betroffen. Fanden sich bei der In-Vivo-Schädigung ungehärteter und gehärteter Blätter Unterschiede in der Frostempfindlichkeit, so lassen sich bei den in vitro in Gegenwart von Salzionen gefrorenen Thylakoiden aus ungehärteten und gehärteten Blättern keine Unterschiede in der Frostempfindlichkeit feststellen. Unter den neuen Versuchsbedingungen konnten somit im wesentlichen ähnliche Ergebnisse von HEBER, SANTARIUS und Mitarbeiter (s.o.) bestätigt werden.

5.5 Einfluß des Preß-Saftes aus *Spinat-* und *Viola*-Blättern auf photosynthetische Reaktionen von Thylakoiden

Eine denkbare Ursache der Frostschädigung von Thylakoiden in vivo, die auch in der Literatur diskutiert wird (s. Senser und Beck, 1979), ist die Freisetzung von Vakuoleninhaltsstoffen nach Schädigung des Tonoplasten während des Frierens oder Auftauens. Auf einen Verlust der Semipermeabilität von Tonoplast und Plasmalemma deuten u.a. auch die Infiltration der Interzellularräume aufgetauter Blätter nach dem Frieren sowie elektronenmikroskopische Befunde hin (Heber, 1968). Da die Vakuole nach Heber (1957) mindestens 50 bis 75% des Zell-Lumens ausfüllt und in den Vakuolen zahlreiche toxische Substanzen wie z.B. Tannine und phenolische Verbindungen enthalten sind, liegt es nahe, in der Freisetzung von Vakuoleninhaltsstoffen eine Ursache für die Frostschädigung des photosynthetischen Apparats zu sehen. Um diese Fragestellung eingehender zu untersuchen, wurden Spinatthylakoide unter verschiedenen Bedingungen dem Einfluß von Zellinhaltsstoffen in rohen Preß-Säften aus *Spinat-* oder *Viola*-Blättern ausgesetzt und anschließend ihre photosynthetische Aktivität gemessen.

5.5.1 Zucker- und Eiweißgehalt des Preß-Saftes von ungehärteten und gehärteten Blättern von *Spinacia oleracea L.* und *Viola x wittrockiana Gams*

Der Zellsaft enthält neben den vermuteten Schadstoffen auch Schutzstoffe (s. Heber und Kempfle, 1970; Volger und Heber, 1975). Da diese wie die Schadstoffe die Ergebnisse der folgenden Experimente beeinflussen können, wurden die potentiellen Schutzstoffe (Zucker und Proteine) bestimmt und in Tab.VIII und Tab.IX aufgeführt.

TAB. VIII: ZUCKERKONZENTRATIONEN IN mM VON ZELLSAFTPRÄPARATIONEN AUS UNGEHÄRTETEN UND GEHÄRTETEN BLÄTTERN VON *Spinacia oleracea L.* UND VON *Viola x wittrockiana Gams*

Probe	Glucose	Fructose	Saccharose	Raffinose	Gesamtzucker
- ungehärtete Blätter von *Spinacia oleracea L.* -					
1	4,3	2,2	7,8	0,5	14,8
2	4,8	3,3	6,4	0,4	14,9
3	4,2	3,1	4,3	0,3	11,9
4	4,2	2,4	17,1	0,2	23,9
- gehärtete Blätter von *Spinacia oleracea L.* -					
1	14,6	6,0	16,5	1,9	39,0
2	28,7	17,2	31,0	1,6	78,5
3 F*	12,0	7,6	65,5	0,5	85,6
4	11,0	6,0	77,9	1,3	96,2
- freilandgehärtete Blätter von *Viola x wittrockiana Gams* -					
5 F*	12,8	13,8	43,3	1,4	71,3

* : F bedeutet, daß das Pflanzenmaterial im Freiland gehärtet wurde.

Mittelwerte Gesamtzucker (Spinat): Ungehärtetes Material: 16,4 ± 2,6 mM
(mit mittlerem Fehler des Mittelwertes) Gehärtetes Material: 74,8 ± 12,5 mM
Die Probennummern geben an, welche Proben aus der gleichen Anzucht stammten.

Der Vergleich der Zuckerkonzentrationen im Zellsaft ungehärteter und gehärteter Spinatpflanzen (Tab.VIII) zeigt eine deutliche Erhöhung der Gesamzuckerkonzentrationen wie auch der Konzentrationen der einzelnen Zucker bei gehärteten Blättern. Diese Erhöhung ist so groß, daß sie trotz der sehr beachtlichen Variabilität der einzelnen Proben untereinander und der geringen Probenzahl gesichert sein dürfte. Die Ergebnisse stimmen auch sehr gut mit den von KÖPPEN (1979) und TRÖSTER (1982) durchgeführten Untersuchungen über Zuckerkonzentrationen in Blättern ungehärteter und gehärteter Spinatpflanzen überein. Die Zuckerkonzentrationen der freilandgehärteten *Viola*-Blätter liegen ebenfalls in der Größenordnung der Werte von gehärteten Spinatblättern.

TAB. IX: PROTEINGEHALT VON ZELLSAFTPRÄPARATIONEN AUS UNGEHÄRTETEN UND GEHÄRTETEN BLÄTTERN VON *Spinacia oleracea L.* UND *Viola x wittrockiana Gams*

Probe	Eiweißgehalt in mg/l**
- ungehärtetes Material *Spinacia oleracea L.* -	
1	0,9 ± 0,15
2	2,4 ± 0,4
3	0,2 ± 0
4	2,3 ± 0,35
- gehärtetes Material *Spinacia oleracea L.* -	
1	0,7 ± 0,2
2	4,8 ± 0,6
3 F*	2,9 ± 0,85
4	2,6 ± 0,3
- freilandgehärtetes Material *Viola x wittrockiana Gams* -	
5 F*	2,0 ± 0,3

*: F bedeutet, daß das Pflanzenmaterial im Freiland gehärtet wurde.

**: Es handelt sich um Mittelwerte der Ergebnisse aus drei Proteinbestimmungsverfahren (nach KJELDAHL (s.u.), LOWRY ET.AL. (1951) und KALCKAR (1947), s.a. Methoden.
Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

Anmerkung: Die Kjeldahl-Bestimmung erfolgte modifiziert nach HILLER ET AL. (1948).
Die Probennummern geben an, welche Proben aus der gleichen Anzucht stammten.

Eine Bewertung der Proteinkonzentrationen ungehärteter und gehärteter Spinatblätter (Tab.IX) läßt sich dagegen nicht vornehmen, da die Werte je nach Probe und Proteinbestimmungsverfahren sehr stark variierten. Der Vergleich von Präparationen aus ungehärtetem und gehärtetem Material gleicher Anzuchtzeiträume läßt aber eine Anstieg der Proteinkonzentration während der Härtung nicht erkennen. Die von VOLGER (1974) und VOLGER UND HEBER (1975) beschriebenen Frostschutzproteine lassen sich mit der hier gewählten Methode nicht gesondert erfassen.

5.5.2 Inaktivierung photosynthetischer Reaktionen von Spinatthylakoiden durch Preßsaft aus Spinat- und Violablättern bei +20 C

Trotz einer erheblichen Streuung der experimentellen Ergebnisse lassen sich einige Informationen aus den Darstellungen in Abb. 33 ablesen, insbesondere wenn man auf Unterschiede zu den bisherigen dargestellten Ergebnissen der Frostschädigung in vivo und in vitro achtet.

Die Hemmung der Phosphorylierung beginnt bereits bei niedrigen Zellsaftkonzentrationen, in Abb. 33a ab ca. 3% Zellsaft im Reaktionsmedium (entsprechend 90 µl Zellsaft auf Thylakoide entsprechend 100 µg Chlorophyll im Reaktionsansatz). Nahezu parallel kommt es zu einer gewissen Verkürzung der Halbwertzeit des 9-Amino-Acridin-Signals. Eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung wird in der Regel zwischen 20 bis 30% Zellsaft im Medium erreicht (entsprechend 600 bis 900 µl Zellsaft auf Thylakoide mit 100 µg Chlorophyll). Das Muster der Schädigung ähnelt dem einer Entkopplung des Elektronentransports von der Photophosphorylierung, wobei allerdings die Stimulation des Elektronentransports nicht immer parallel zur Hemmung der Photophosphorylierung erfolgt und nicht immer die Höhe des mit NH_4Cl entkoppelten Elektronentransports erreicht. In einem kleineren Teil der Experimente bleibt der gekoppelte Elektronentransport mit steigender Saftkonzentration in der Höhe nahezu unverändert (nicht dargestellt) oder fällt bei sehr hohen Saftkonzentrationen geringfügig ab, wie dies in Abb. 33b zu sehen ist. Der mit NH_4Cl entkoppelte Elektronentransport bleibt dagegen weitgehend unverändert (Abb. 33a) oder zeigt eine geringfügige Abnahme der Rate mit zunehmender Saftkonzentration (nicht dargestellt). Diese Hemmung ist erheblich geringer als bei Thylakoiden aus

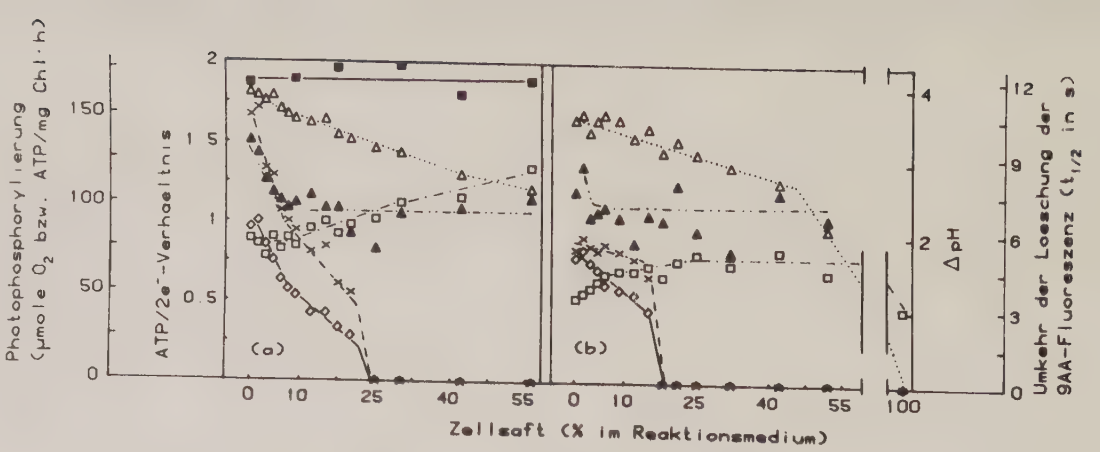

Abb. 33 A, B: Inaktivierung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern durch Preß-Saft (Präparation s. 4.2.2.1) aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern bei +20 C. Der Preß-Saft (Zellsaft) wurde kurz vor der Messung dem Reaktionsansatz zugesetzt. Auf der Abszisse ist der Anteil des Zellsaftes am Reaktionsansatz in Vol% angegeben. —·—·—□—·—·— nichtzyklischer Elektronentransport mit 1 mM K_3 ($Fe(CN)_6$) als Elektronenakzeptor in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 1,5 mM ADP. ———■——— entkoppelter Elektronentransport mit 1 mM K_3 ($Fe(CN)_6$) als Elektronenakzeptor in Gegenwart von 10 mM KH_2PO_4 und 5 mM NH_4Cl. — — —×— — —Photophosphorylierung (enzymatische Bestimmung). ———◇——— Kopplung (ATP/2e⁻). ·····△·····Δ pH (ermittelt nach 4.1.3.6 mit 9-Amino-Acridin). ··—··▲—··— Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 4 Experimenten.
Zuckergehalt des Preßsafts: a) 4,2 mM Glucose, 3,1 mM Fructose, 4,3 mM Saccharose, 0,3 mM Raffinose, b) 12 mM Glucose, 7,6 mM Fructose, 65,5 mM Saccharose, 0,5 mM Raffinose

frostgeschädigten Blättern (s. 5.1.3). Der Δ pH erweist sich wie in nahezu allen übrigen Untersuchungen zur Frostschädigung als der am wenigsten beeinflußte Parameter. Mit zunehmender Zellsaftkonzentration kommt es aber zu einer Abnahme der lichtinduzierten H^+-Aufnahme (nicht dargestellt).

Bei den in Abb. 33 zwischen den dargestellten Experimenten mit Thylakoiden und Zellsaft aus ungehärteten und gehärteten Spinatblättern sichtbaren Unterschieden im Verlauf der Hemmung der einzelnen Parameter handelt es sich wohl um Variabilitäten der einzelnen Zellsaftpräparationen, die unabhängig von der Härtung auftraten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Preßsaft, der bei +20 C Thylakoiden zugefügt wird, bei einem Verhältnis von 600 µl Preßsaft auf Thylakoide entsprechend 100 µg Chlorophyll zu einer Entkopplung der Photophosphorylierung vom nichtzyklischen Elektronentransport führt. D.h. es kommt zu einem Zusammenbruch der Phosphorylierung infolge einer erhöhten H^+-Duchlässigkeit der Thylakoidmembran. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Thylakoiden aus frostgeschädigten Blättern (in vivo) ist keine so ausgeprägte Schädigung des Elektronentransportsystems nachweisbar. Ebenso sind keine reproduzierbaren Unterschiede in der Empfindlichkeit von Thylakoiden aus ungehärteten und gehärteten Blättern sowie im Schadpotential von Preßsaft aus ungehärteten und gehärteten Blättern nachweisbar.

In einer weiteren experimentellen Serie wurde dem Reaktionsansatz mit Spinatthylakoiden Preßsaft von *Viola x wittrockiana Gams* zugesetzt. Die Isolierung photosynthetisch aktiver Thylakoide aus Blättern von *Viola* ist sehr schwierig. Bei zahlreichen eigenen Versuchen dieser Art konnten auch in Gegenwart der in solchen Fällen üblichen Schutzstoffe nur entkoppelte Thylakoide mit einer

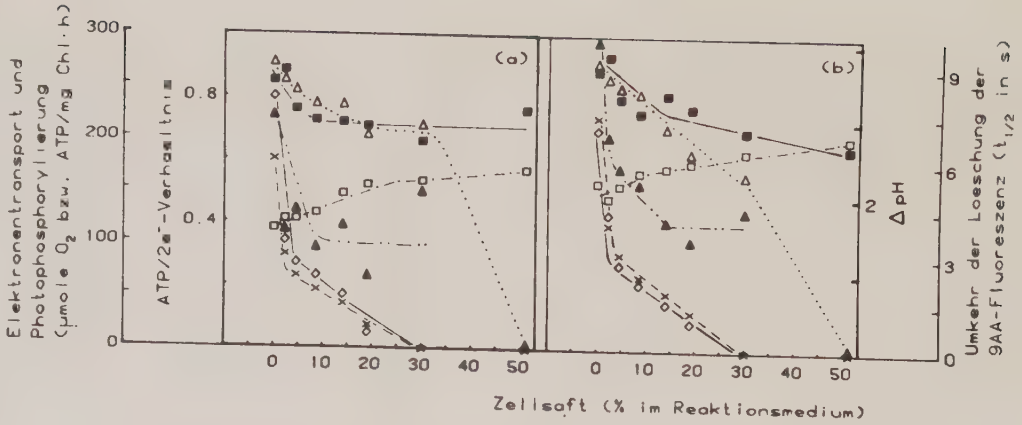

ABB. 34 A, B: Inaktivierung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern durch Preß-Saft (Zellsaft) aus freilandgehärteten *Viola*-Blättern (Präparation s. 4.2.2.1) bei +20 C. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 33.

—·—·□—·—· nichtzyklischer Elektronentransport unter photophosphorylierenden Bedingungen. ——■—— entkoppelter Elektronentransport. — — —×— — — Photophosphorylierung. ——◇—— Kopplung ADP/2e⁻

·····△····· Δ pH. —··—▲··—·· Halbzeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Fluoreszenz.

Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten.

Zuckergehalt des Preßsafts: 12,8 mM Glucose, 13,8 mM Fructose, 43,3 mM Saccharose, 1,4 mM Raffinose

geringen Elektronentransportrate um 30 µMole/mg Chl. • h erhalten werden. Es darf daher angenommen werden, daß der Preßsaft von *Viola x wittrockiana Gams* erheblich mehr Schadstoffe enthält als der Preßsaft von *Spinacia oleracea L.*. Durch Preßsaft verursachte Schädigungen - ev. auch des Elektronentransports - könnten daher deutlicher zu sehen sein als bei Preßsaft aus Spinatblättern.

Die in Abb. 34 dargestellten Ergebnisse bestätigen im großen und ganzen die in den Untersuchungen mit Spinatzellsaft erhaltenen Daten: Es kommt zu einer starken Inaktivierung der Photophosphorylierung bei sehr geringen Preßsaftkonzentrationen (unterhalb 2% des Reaktionsansatzes), ebenso zeigt die parallel erfolgende Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals eine Entkopplung an. Der Δ pH wird ebenfalls betroffen, ist aber bei mittleren Saftkonzentrationen noch relativ hoch und bricht erst bei mehr als 30% Saft im Ansatz vollständig zusammen. Die ebenfalls bei recht niedrigen Saftkonzentrationen (ab 2%) einsetzende Stimulation des gekoppelten Elektronentransports ist dagegen geringer als infolge der Entkopplung zu erwarten wäre und erreicht in einem Teil der Experimente auch bei sehr hohen Saftkonzentrationen nicht die Werte des mit NH_4Cl entkoppelten Elektronentransports. Dieser NH_4Cl-entkoppelte Elektronentransport wird von allen Meßparametern am geringsten geschädigt und ist auch bei Preßsaftkonzentrationen oberhalb 50% nur um 15 bis 30% gegenüber den Kontrollwerten erniedrigt.

Auch bei *Viola*-Preßsaft kommt es demnach hauptsächlich zu einer Entkopplung mit Erniedrigung des Δ pH und Hemmung der Photophosphorylierung, während der Elektronentransport nur geringfügig geschädigt wird. Die Effekte sind lediglich drastischer als beim Spinatpreßsaft. Signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit

von Thylakoiden aus ungehärteten und gehärteten Spinatmaterial gegenüber dem Preßsaft lassen sich nicht feststellen. Diese Experimente schließen aber das Vorhandensein membrantoxischer Substanzen im Zellsaft bzw. in den Vakuolen in situ nicht völlig aus. Wie schon einleitend erwähnt, ist die Isolierung aktiver Thylakoidmembranen aus *Viola*-Blättern sehr schwierig. Es ist daher denkbar, daß sich die gesuchten Schadstoffe während des Preßvorganges an die Membranen der *Viola*-Blätter angelagert haben und deshalb nicht im Preßsaft erscheinen. Auch könnten die Schadstoffe in bestimmten Kompartimenten in toxischen Konzentrationen vorliegen, beim Preßvorgang aber durch Inhaltsstoffe anderer Kompartimente verdünnt oder neutralisiert werden. Auf diese Problematik in der Bewertung der experimentellen Ergebnisse wird bei der Darstellung der folgenden Experimente mit Zellsaft und in der Diskussion noch weiter eingegangen werden.

5.5.3 Einfluß des Preßsaftes aus Spinatblättern bei 0 C auf photosynthetische Reaktionen von Spinatthylakoiden

Die Zugabe von Preßsaft bei +20 C entspricht nicht den physiologischen Abläufen während und nach dem Frieren. Denkbar wäre, daß Thylakoide bei Temperaturen um den Gefrierpunkt infolge einer anderen Membrankonstitution (zur Membranalteration bei +15 C s. Jensen et al., 1981) empfindlicher oder anders auf Zellinhaltsstoffe reagieren als bei +20 C. Den natürlichen Verhältnissen während und nach dem Auftauen entspräche im In-Vitro-Experiment am ehesten die Inkubation von Thylakoiden mit Preßsaft bei 0 C. Um die Wirkung der Vakuoleninhaltsstoffe auf Thylakoide zu testen, wurden Thylakoide in einer kleinen

Menge des hypotonischen Isolierungsmediums VI (50 mM Sorbit, 60 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Ascorbat, 40 mM HEPES, pH 6,1 mit NaOH) im Verhältnis von 1 ml Medium auf 1 g Spinatblätter durch Zerkleinerung der Blätter mit dem Waring-Blender freigesetzt. Das Homogenat wurde danach bis zur Durchführung der weiteren Präparationsschritte der Thylakoidisolierung (nach 4.2.1.3) bei 0 C stehengelassen. Nach der Isolierung wurden die photosynthetischen Aktivitäten dieser Thylakoide gemessen und mit den Aktivitäten von Thylakoiden aus sofort nach der Homogenisation isolierten Kontrollen verglichen.

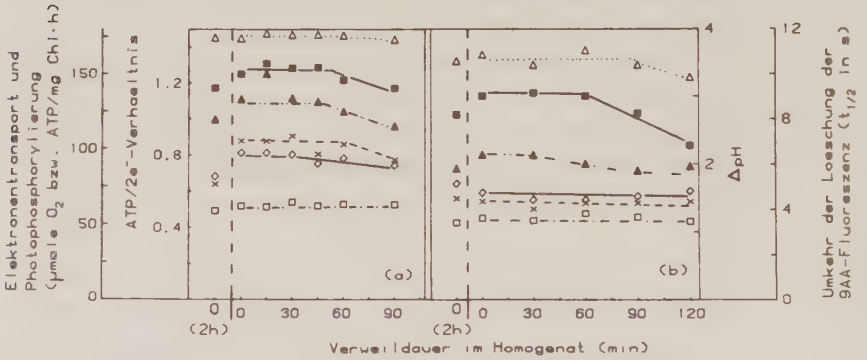

Abb. 35 A, B: Inaktivierung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern, die in einem hypotonischen Isolierungsmedium (50 mM Sorbit, 60 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Ascorbat, 40 mM HEPES, pH 6,1 mit NaOH) im Verhältnis 1 ml/1 g Blattgemisch mit einem Homogenisator freigesetzt und bis zur Isolierung (nach 4.2.1.3) im Homogenat bei 0 C aufbewahrt wurden. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen von Abb. 33. — · — · □ — · — · Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen. ——■—— entkoppelter Elektronentransport. — –×– – – Photophosphorylierung. ——◇—— Kopplung: ATP/2e⁻ ·····△····· Δ pH. —··—▲—··—·· Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
In beiden Teilen der Abbildung sind links die Meßwerte der 0 h-Kontrollen 2 Stunden nach der Isolierung aus dem Homogenat aufgeführt, die die Alterung der Proben über den Versuchszeitraum (unabhängig vom Einfluß der Zellinhaltsstoffe) wiedergeben.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 35 wiedergegeben. Es zeigen sich nach etwa 60 Minuten geringe Einbußen der Phosphorylierung gegenüber den Kontrollen sowie Zeichen einer geringen Entkopplung (Verkürzung der Halbwertzeit des 9-Amino-Acridin-Signals). Die Minderung der Raten liegt aber - wie die zweiten Meßwerte der sofort isolierten Kontrollen am Ende der Versuchsreihe zeigen - im Rahmen der Alterung von Thylakoiden mit der Zeit. Erst nach 2 Stunden Verweildauer im Homogenat, kommt es in einigen Experimenten beim entkoppelten Elektronentransport und dem Δ pH zu Einbußen von 10% bis 20%, die sich nicht auf die Alterung der Thylakoide zurückführen lassen.

Um mögliche Effekte des Preßsaftes im Homogenat zu verstärken, wurden in den Experimenten zur Abb.36 Thylakoide nach der Homogenisation der Blätter in einer Mischung aus 50% Spinatpreßsaft und 50% eines Mediums mit 30 mM Sorbit und 50 mM NaCl (pH 6,7) über längere Zeit bei 0 C bis zur Isolierung der Thylakoide aufbewahrt. Dies führte (nach 4 bzw. 7 Stunden Aufbewahrung im Homogenat) zu einer Abnahme aller photosynthetischen Reaktionen der Thylakoide. Besonders die Abnahme der Photophosphorylierung, des mit NH_4Cl entkoppelten Elektronentransport und die Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals sind erheblich, während der gekoppelte Elektronentransport nur geringfügig betroffen ist.

Ob es sich dabei um Alterungseffekte oder um eine Schädigung durch Zellinhaltsstoffe handelt, zeigt wieder der Vergleich der Meßwerte der nach 4 bzw. 7 Stunden isolierten und gemessenen Thylakoide mit den zweiten Meßwerten von sofort isolierten ungefrorenen Kontrollen, die bis zum Ende der Messung aller Proben im Isolierungsmedium III (330mM Sorbit, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 mM HEPES, 0,4% Rinderserumalbumin, pH 6,7 mit NaOH) bei 0 C aufbewahrt worden waren:

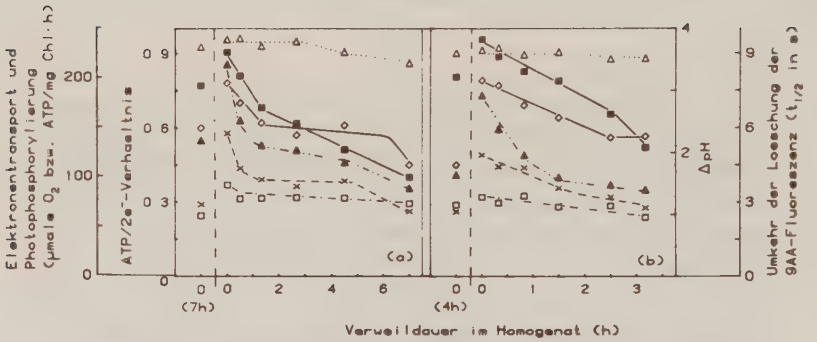

Abb. 36 A, B: Inaktivierung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern, die in einem Gemisch von 50% Preßsaft und 50% hypotonischem Isolierungsmedium (50 mM Sorbit, 60 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 6,1 mit NaOH) im Verhältnis von 1 ml Mischung auf 1 g Spinatblätter mit einem Homogenisator freigesetzt und bis zur Isolierung im Homogenat bei 0 C aufbewahrt wurden. Der Preßsaft stammte aus ungehärteten (a) und aus gehärteten (b) Spinatblättern (Präparation s. 4.2.2.1). Auf der Abszisse ist die Dauer der Aufbewahrung bei 0 C angegeben. Reaktionsbedingungen wie für Abb. 33. —·—□—·— Elektronentransport. ———■——— Entkoppelter Elektronentransport. — — —×— — — Photophosphorylierung. ———◇——— Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△····· Δ pH. ··—··▲—·· Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
In beiden Teilen der Abbildung sind links die Meßwerte der Oh-Kontrollen 7 Stunden bzw. 4 Stunden nach der Isolierung aus dem Homogenat aufgeführt, die die Alterung der Proben über den Versuchszeitraum (unabhängig vom Einfluß der Zellinhaltsstoffe) wiedergeben.
Zuckergehalt des Preßsafts: a) 4,2 mM Glucose, 2,4 mM Fructose, 17,1 mM Saccharose, 0,2 mM Raffinose; b) 11 mM Glucose, 6 mM Fructose, 77,9 mM Saccharose, 1,3 mM Raffinose
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten

Für die Meßwerte der Photophosphorylierung, des gekoppelten Elektronentransports und der Halbwertszeit zeigen sich keine Unterschiede zwischen den im Medium aufbewahrten Kontrollen und den im Homogenat bis zur Isolierung belassenen Thylakoiden. Dagegen liegen die nach 4 bzw. 7 Stunden gemessenen Kontrollwerte des Δ pH und des NH_4Cl-entkoppelten Elektronentransport erheblich oberhalb der Werte von Proben, die im Preß-Saft/Medium-Homogenat aufbewahrt worden waren. Die Abnahme des Δ pH und des entkoppelten Elektronentransports ist daher wohl auf eine Schädigung der Thylakoide durch den Zellsaft zurückzuführen, während

es sich bei der Entkopplung mit Inaktivierung der Phosphorylierung und der Verkleinerung der Halbwertszeit um einen Alterungseffekt handeln kann. Beim gekoppelten Elektronentransport scheinen dagegen entkoppelnde (stimulierende) Effekte infolge der Alterung der Thylakoide durch Schadeffekte des Preßsaftes kompensiert zu werden, so daß insgesamt der gekoppelte Elektronentransport im wesentlichen unverändert erscheint.

Somit ähneln die Effekte durch Preßsaft partiell den Ergebnissen aus In-Vivo-Experimenten (KLOSSON, 1978) aber bezüglich der schwachen Entkopplung auch den Ergebnissen aus den In-Vitro-Experimenten mit Salzionen (HEBER, 1967; HEBER UND SANTARIUS, 1964; SANTARIUS, 1969, 1971A). Auch nach 7 Stunden im Zellsaft/Medium-Gemisch wird bei den Thylakoiden aber keine so drastische Hemmung von photosynthetischen Reaktionen - wie es sowohl bei der Frostschädigung in vivo wie auch z.T. in vitro zu sehen ist - beobachtet.

Die relativ geringe Inaktivierung der Thylakoidreaktionen durch Zellinhaltsstoffe in den vorangehenden Experimenten könnte darauf zurückgeführt werden, daß die Zellinhaltsstoffe durch das zugesetzte Isolierungsmedium zu stark verdünnt worden sind. Um diesen vermuteten Verdünnungseffekt auszuschalten, wurden Thylakoide ohne Medium durch Zerreiben der Blätter mit Seesand bei 0 C freigesetzt. Dieser Vorgang dürfte am ehesten einer Aufhebung der Kompartimentierung in der Zelle durch die Frostschädigung entsprechen. Das Homogenat wurde für unterschiedliche Zeiten bei 0 C stehengelassen, ehe die Thylakoide isoliert und ihre photosynthetischen Aktivitäten bestimmt wurden (Abb. 37). Diese Versuche bestätigen die Daten der Experimente mit Preßsaft. Berücksichtigt man die Alterung der Thylakoide (s. zweite Meßwerte der Kontrolle), so läßt sich im Experiment von Abb. 37 nur die Inaktivierung des entkoppelten Elektronentransports als Schädigung durch Inhaltsstoffe des Zellsaftes interpretieren.

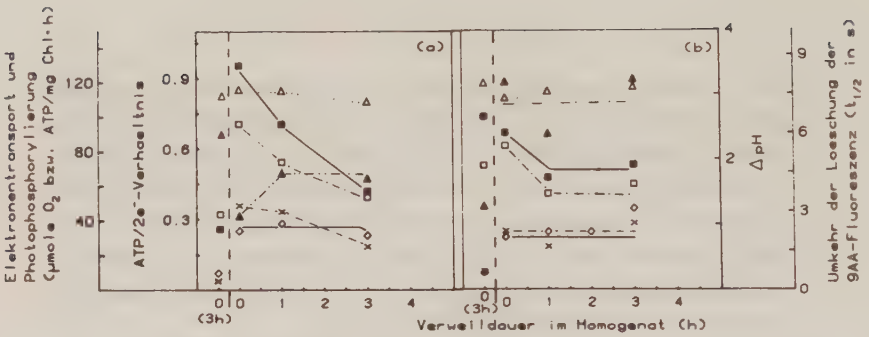

Abb. 37 A, B: Inaktivierung von Thylakoiden, die mit Seesand aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern im Mörser freigesetzt und im Homogenat bis zur Isolierung (Sorbitisolierung, s. 4.2.1.5) bei 0 C aufbewahrt wurden. Auf der Abszisse ist die Dauer der Aufbewahrung bei 0 C angegeben. Die weiteren experimentellen Bedingungen entsprechen den in Abb. 33 aufgeführten Angaben. —·—·□—·—·Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen.
——■—— entkoppelter Elektronentransport
— — —×— — —Photophosphorylierung. ——◇——
Kopplung: ATP/2e⁻ ·····△·····Δ pH —··—▲··—··
Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
In beiden Teilen der Abbildung sind links die Meßwerte der 0h-Kontrollen 3 Stunden nach der Isolierung aus dem Homogenat aufgeführt, die die Alterung der Proben über den Versuchszeitraum (unabhängig vom Einfluß der Zellinhaltsstoffe) wiedergeben.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl aus je 3 Experimenten.

Um die Einwirkung der Zellinhaltsstoffe auf Thylakoide zu verstärken und die Konzentration der schützenden Zucker im Ansatz konstant zu halten, wurden isolierte Thylakoide in eine Mischung gegeben, die neben 1 Teil Thylakoidsuspension 3 Teile Zellsaft und 6 Teile eines speziellen Verdünnungsmedium enthielt. Das Verdünnungsmedium enthielt verschiedene Zucker in den gleichen Konzentrationen wie der Zellsaft, so daß die Zuckerkonzentration des Ansatzes mit der des Zellsaftes übereinstimmte. Außerdem wurde so eine Endkonzentration von 33 mM für NaCl eingestellt.

Die in Aqua dest. aufgenommene Thylakoidsuspension (aus einer NaCl-Isolierung) war so konzentriert, daß nach Mischen des Ansatzes ein Verhältnis von 100 µg Chlorophyll zu 30 µl Zellsaft bestand.

Bei Experimenten dieser Art werden in den Abbildungen als Kontrollen die Meßwerte der Proben aufgeführt, die sofort zu Beginn des Experiments nach dem Mischen gemessen wurden. Bei allen Versuchsserien wurden aber zwei Typen von Kontrollen mitgeführt: Eine als K 2 bezeichnete Kontrolle, die wie die Proben 30% Preßsaft enthielt und in den Abbildungen aufgeführt ist, und eine als K 1 bezeichnete Kontrolle, die keinen Preßsaft enthielt, sondern (bei gleicher Chlorophyllkonzentration wie K 2) mit 90% Verdünnungsmedium angesetzt worden war. K 1 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 42 nicht aufgeführt. Aus den Unterschieden zwischen beiden Kontrollen kann man aber Rückschlüsse auf die Wirkung des Zellsaftes bei 0 C ziehen (Tab.X):

Trotz der Streuung der Meßwerte sind in Tab.X bestimmte Tendenzen bei Betrachtung der Mittelwerte klar sichtbar. Z.T. werden die Raten des gekoppelten nichtzyklischen Elektronentransports und noch deutlicher des mit NH_4Cl entkoppelten Elektronentransports durch Zugabe des Zellsaftes erniedrigt. Diese Erniedrigung beträgt beim entkoppelten Elektronentransport ca 20% bis 30% der Rate der nicht mit Preßsaft behandelten Kontrolle. Ebenfalls erfährt die Photophosphorylierung eine Inaktivierung um ca 20%. Die Kopplung zeigt unterschiedliche Ergebnisse: Bei ungehärteten Material (Thylakoide aus ungehärteten Spinatblättern + Preßsaft aus ungehärteten Spinatblättern) nimmt sie nach Zugabe von Zellsaft ab. Allerdings ist dieser Effekt sehr gering. Die Unterschiede liegen noch innerhalb der Streuung. Deutlicher zu sehen ist die Entkopplung an der Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals nach Zugabe des Zellsaftes.

TAB. X: Vergleich der Kontrollen ohne Zellsaftzusatz (K 1) und mit 30% Zellsaftzusatz (K 2) im Thylakoid-Aufbewahrungsmedium (0 C) der Experimente zu Abb. 42

nichtzyklischer Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen		Photophosphorylierung		Mit NH_4Cl entkoppelter Elektronentransport	
(µ Mole O_2 bzw. ATP/mg Chl. h)					
K 1	K 2	K 1	K 2	K 1	K 2
ungehärtetes Spinatmaterial					
48,7 ± 1	45,5 ± 2,7	81,5 ± 11,1	65,1 ± 9,1	148,1 ± 9,0	121,3 ± 9,5
gehärtetes Spinatmaterial					
70,6 ± 6,8	56,1 ± 3,4	113,0 ± 13,1	92,5 ± 13,5	197,5 ± 16,0	143,2 ± 14,4

Kopplung ATP/$2e^-$		Δ pH		Halbwertzeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz (t 1/2 in s)	
K 1	K 2	K 1	K 2	K 1	K 2
ungehärtetes Spinatmaterial					
0,83 ± 0,1	0,70 ± 0,07	3,66 ± 0,05	3,70 ± 0,06	9,1 ± 1,1	7,0 ± 0,5
gehärtetes Spinatmaterial					
0,88 ± 0,11	0,96 ± 0,12	3,60 ± 0,09	3,63 ± 0,09	8,2 ± 0,7	7,4 ± 0,3

Es handelt sich um die Mittelwerte aus 6 (ungehärteter Spinat) und 5 (gehärteter Spinat) Experimenten. Zusätzlich ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. Zu den experimentellen Daten s. Methoden sowie Abb. 42

die Entkopplung an der Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals nach Zugabe des Zellsaftes. Bei gehärtetem Material (Thylakoide aus gehärteten Spinatblättern + Preßsaft aus gehärteten Spinatblättern) bleibt die Kopplung dagegen in der Größe der Kontrolle ohne Preßsaft. Dem entspricht auch, daß die 9-Amino-Acridin-Halbwertszeit bei gehärtetem Material nur sehr wenig abnimmt, während sie bei ungehärtetem Material ca 20 bis 30% kürzer wird. Die Höhe des Δ pH bleibt von der Zugabe von Preßsaft bei 0 C unbeeinflußt.

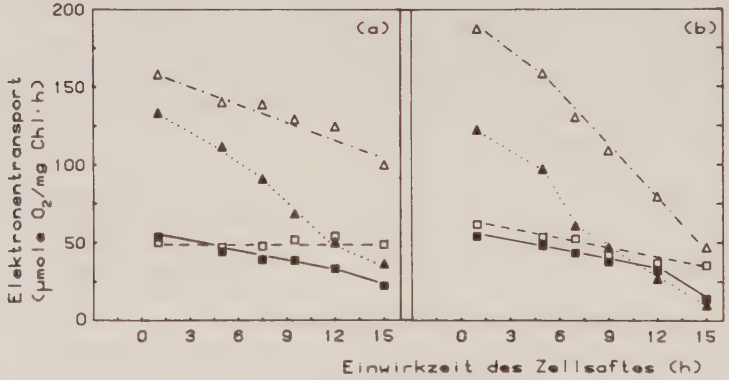

Abb. 38 A, B: Einfluß von Zellinhaltsstoffen auf den Elektronentransport von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern als Funktion der Einwirkzeit. Verglichen werden Thylakoide in einem Ansatz aus 30% Preßsaft von ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern und 60% Verdünnungsmedium (gleiche Zuckerkonzentration wie Saft, NaCl-Endkonzentration von 33 mM im Ansatz, pH 6,7) mit Thylakoiden der gleichen Isolierung, die über den gleichen Zeitraum in 90% Medium bei 0 C aufbewahrt worden waren. Die experimentellen Bedingungen der Messung entsprechen den Angaben bei Abb. 33. – –□– – Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen in Abwesenheit von 30% Preßsaft. ——■—— Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen in Anwesenheit von 30% Preßsaft. —·—·Δ—·—·entkoppelter Elektronentransport in Abwesenheit von 30% Preßsaft. ·····▲····· entkoppelter Elektronentransport in Anwesenheit von 30% Preßsaft.

Zuckergehalt des Preßsafts: a) 4,3 mM Glucose, 2,2 mM Fructose, 7,8 mM Saccharose, 0,5 mM Raffinose; b) 12 mM Glucose, 7,6 mM Fructose, 65,5 mM Saccharose, 0,5 mM Raffinose
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten

Die Aktivitätseinbußen der Thylakoide durch Preßsaft sowie die Unterschiede zwischen gehärtetem und ungehärtetem Material treten noch deutlicher zutage, wenn man die Inaktivierung der photosynthetischen Reaktionen über mehrere Stunden bei 0 C verfolgt, wie es in Abb. 38 bis 40 dargestellt ist. Die Probe mit den ohne Preßsaft bei 0 C inkubierten Thylakoiden gibt die Inaktivierung infolge des Alterungsvorgangs der Thylakoide im Medium wieder. Wenn die Thylakoide in der Probe mit 30% Preßsaft mit der Zeit stärker inaktiviert werden, ist an einen schädigenden Einfluß des Preßsaftes zu denken. Werden die Thylakoide dagegen weniger stark inaktiviert, ist ein schützender Effekt des Preßsaftes vorstellbar.

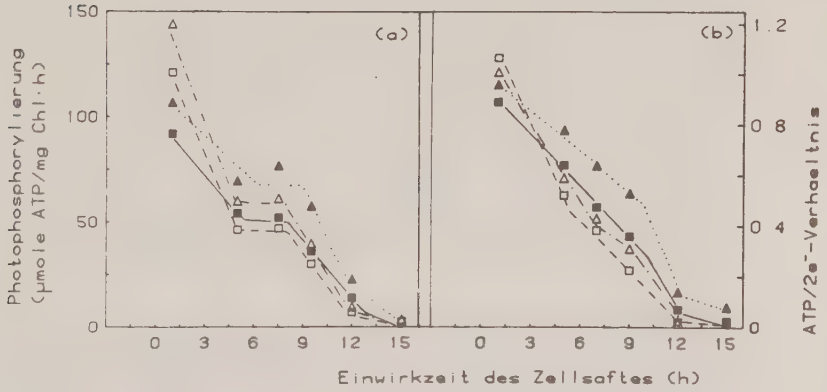

Abb. 39 A, B: Einfluß von Zellinhaltsstoffen auf die Photophosphorylierung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern bei 0 C als Funktion der Einwirkzeit. Die Ansätze wurden so behandelt wie in Abb. 38 beschrieben. Die experimentellen Bedingungen entsprechen den in Abb. 33 aufgeführten Angaben. — — □ — — Photophosphorylierung in Abwesenheit von 30% Preßsaft. ——■—— Photophosphorylierung in Anwesenheit von 30% Preßsaft. — · — · △ — · — · Kopplung: ATP/2e⁻ in Abwesenheit von 30% Preßsaft. · · · · ▲ · · · · Kopplung: ATP/2e⁻ in Anwesenheit von 30% Preßsaft.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Die Raten des gekoppelten Elektronentransports (Abb. 38) sind bei beiden Ansätzen sowohl bei ungehärtetem wie bei gehärtetem Material nur wenig verschieden. Dagegen liegen zu Beginn der Aufbewahrungszeit die Raten des entkoppelten Elektronentransports der mit Preßsaft behandelten Proben immer unter denen der Proben ohne Preßsaft; hier müssen zeitunabhängige Hemmeffekte eine Rolle spielen, die auch oben (s. Tab.X) bereits aufgefallen sind. Im weiteren Verlauf (über 15 Stunden) fallen beim ungehärteten Material sowohl der gekoppelte wie der entkoppelte Elektronentransport der Proben mit Preßsaft stärker ab als bei den unbehandelten Proben. Dies kann als Folge einer langsam fortschreitenden Schädigung der Thylakoide durch Zellinhaltsstoffe gedeutet werden. Beim gehärteten Material sind die Werte der mit Preßsaft inkubierten Thylakoide zwar zu Beginn auch niedriger, aber der Abfall der Raten mit der Zeit erfolgt weitgehend parallel zu den Alterungsvorgängen der unbehandelten Proben. Neben der schon bei der Besprechung von Tab.X erwähnten Abnahme der Elektronentransportrate sofort nach Zugabe des Preßsaftes ist beim gehärteten Material keine zeitabhängige Schädigung des Elektronentransports zu sehen, die den Zellinhaltsstoffen zugeordnet werden kann.

Die Phosphorylierungsrate der mit Preßsaft inkubierten Thylakoide (Abb. 39) ist zu Beginn niedriger als die der unbehandelten Proben. Im Laufe der Zeit fallen aber die Raten der mit Preßsaft behandelten Thylakoide langsamer ab. Nach einigen Stunden liegen sie oberhalb der anderen Proben. Parallel zur Inaktivierung der Phosphorylierung verhält sich die Kopplung. Dieser Effekt, der als Schutzwirkung des Preßsaftes gedeutet werden kann, ist bei gehärtetem Material stärker ausgeprägt als bei ungehärtetem Material. Der Δ pH (Abb. 40) ist bei den mit Preßsaft behandelten Thylakoiden gegenüber den unbehandelten Thylakoiden nur nach längerer Einwirkung geringfügig erniedrigt (ungehärtetes Material) bzw. unverändert (gehärtetes Material).

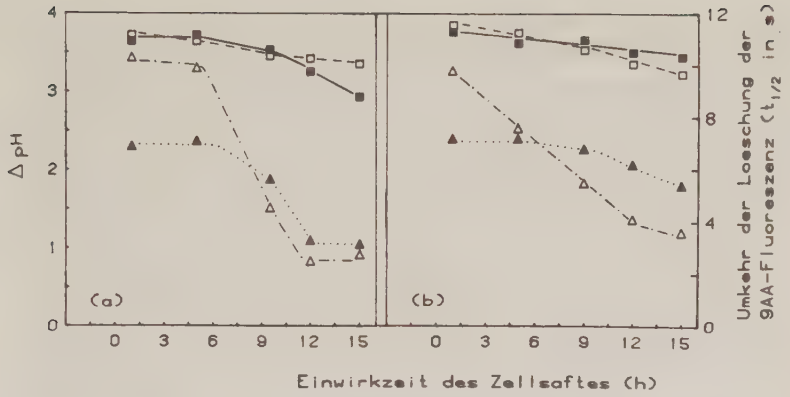

Abb. 40 A, B: Einfluß von Zellinhaltsstoffen auf den lichtinduzierten Δ pH und die Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz. Dargestellt sind die Ergebnisse von Experimenten mit Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern bei 0 C als Funktion der Einwirkzeit. Die Ansätze entsprechen den in Abb. 38 beschriebenen Experimenten, die experimentellen Bedingungen der Messung entsprechen den Angaben in Abb. 33. — —□— — Δ pH in Abwesenheit von 30% Preßsaft. ——■—— Δ pH in Anwesenheit von 30% Preßsaft. —·—·△—·—· Halbwertszeit in Abwesenheit von 30% Preßsaft. ·····▲····· Halbwertszeit in Anwesenheit von 30% Preßsaft.

Für eine gewisse Schutzwirkung des Zellsaftes auf die Phosphorylierung spricht auch das Verhalten der Halbwertszeit der Umkehr der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz (Abb. 40). Bei den mit Preßsaft versetzten Proben sind die Zeiten zwar anfangs kürzer, nehmen aber über den Beobachtungszeitraum weniger ab als die Halbwertszeiten der unbehandelten Proben. Beim gehärteten Material ist dieser Effekt so stark ausgeprägt, daß die Zeiten der mit Preßsaft behandelten Proben gegen Ende des Beobachtungszeitraums deutlich über denen der unbehandelten Proben liegen.

Während der Elektronentransport durch Preßsaft bei 0 C je nach Bedingungen und Preßsaft-Präparationen mehr oder weniger stark gehemmt wird, bleibt die Phosphorylierung und die Fähigkeit der Thylakoidmembran zum Aufbau eines ausreichend hohen Δ pH weitgehend unbeeinflußt bzw. die Thylakoide werden sogar vor einer Schädigung durch andere Einflußfaktoren (z.B. Alterung) geschützt. Der Preßsaft muß Inhaltsstoffe besitzen, die die Thylakoidmembranen stabilisieren und so vor einer raschen Entkopplung schützen. Diese Schutzeffekte sind bei gehärtetem Material, dessen Preßsaft einen höheren Schutzstoffgehalt besitzt (s. Tab.VIII/IX), deutlicher sichtbar als bei ungehärtetem Material. Die Schutzwirkung des Zellsaftes gilt aber nur für den Fall der Inkubation über längere Zeiträume. Dagegen kommt es zeitunabhängig zu hemmenden Effekten auf Thylakoidreaktionen, wenn Zellsaft mit Thylakoiden in Kontakt gebracht wird (s. Tab. X).

5.5.4 Einfluß des Preßsaftes aus Spinatblättern auf photosynthetische Reaktionen von Spinatthylakoiden während des Frierens

Da das in 5.5.3 dargestellte Schadmuster und Schadensausmaß nicht in allen Ergebnissen der In-Vivo-Schädigung durch Frosteinwirkung entspricht, ist es möglich, daß ein nicht unerheblicher Teil des Frostschadens bereits während des Frierens gesetzt wird; z.B., indem schädigende Zellinhaltsstoffe bereits während des Frierens in die Chloroplasten eindringen. Eine Schädigung der Pflanzenzelle während des Frierens ist z.B. von Stout et al. (1980,1981) für Zweige von *Amelanchier alnifolia Nutt.*, einer kanadischen Baumart, beobachtet worden.

Möglich ist auch, daß der Schädigung durch Zellinhaltsstoffe beim Auftauen erst eine Umlagerung von Molekülen in der Membran während des Frierens vorausgehen muß. Strukturänderungen der Membran während des Frierens, durch die die Zelle empfindlicher für physikochemische Einflüße werden soll, wurden bereits von WIEST UND STEPONKUS (1978) angenommen. Zur Klärung der Frage, ob Zellinhaltsstoffe eventuell während des Frierens eine schädigende Wirkung auf Thylakoide entfalten, wurden Spinatthylakoide in Gegenwart von Preßsaft bis auf -40 C gefroren und nach dem Auftauen die Thylakoidreaktionen gemessen.

In einer ersten Serie wurden Thylakoide wie für die Untersuchungen bei 0 C (s. 5.5.3) durch Homogenisation der Blätter in einem hypotonischen Medium mit einem Verhältnis von 1 ml Medium auf 1 g Blätter freigesetzt und das Homogenat vor der Isolierung der Thylakoide einem Gefrierprogramm bis zu -40 C unterworfen. Nach dem Auftauen des Homogenats und anschließender Isolierung der Thylakoide sah man nur geringe Einbußen photosynthetischer Aktivitäten (nicht dargestellt). Diese Einbußen entsprachen aber meist der alterungsbedingten Inaktivierung nicht gefrorener Kontrollen, die nach der Isolierung für die Dauer des Kälteprogramms bei 0 C aufbewahrt worden waren. Dagegen war die stärkere Abnahme der Raten des entkoppelten Elektronentransports und in einigen Fällen auch der Photophosphorylierung von 0 C bis -40 C in Experimenten mit Homogenaten aus ungehärteten Spinatblättern nur z.T. mit der Alterung der Thylakoide erklärbar. Da die Ergebnisse dieser Experimente weitgehend den Ergebnissen der in Abb. 41 dargestellten Experimente entsprachen, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

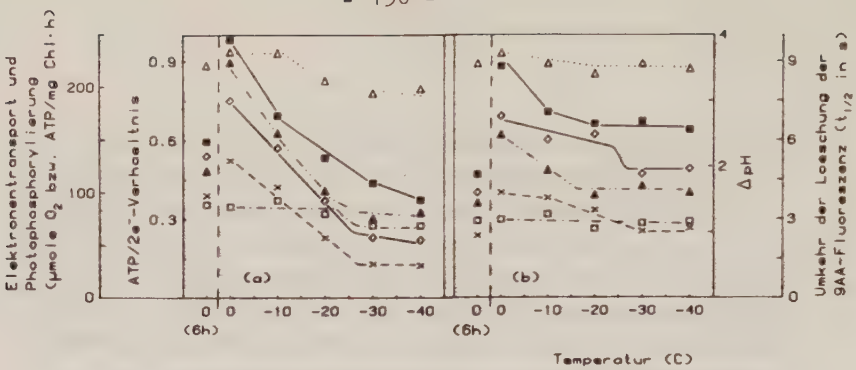

Abb. 41A, B: Photosynthetische Aktivitäten von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern, die in einem Gemisch von 50% Preßsaft und 50% hypotonischen Isolierungsmedium (50 mM Sorbit, 60 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Ascorbat, 40 mM HEPES, pH 6,1 mit NaOH) im Verhältnis von 1ml Mischung auf 1 g Blattgewicht homogenisiert wurden. Vor der Isolierung der Thylakoide (s. 4.2.1.4) wurde das Homogenat gefroren (Kälteprogramm: Frieren mit 12 C/h, 1 h Verweildauer bei der tiefsten Temperatur, Auftauen mit 12 C/h). Der Preßsaft stammte aus ungehärteten (a) und aus gehärteten (b) Spinatblättern. Auf der Abszisse ist die Verweiltemperatur des Kälteprogramms angegeben. Zu den experimentellen Bedingungen s. Abb. 33.
—·—·□—·—· Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen. ——■—— entkoppelter Elektronentransport.
— — —×— — — Photophosphorylierung. ——◇—— Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△····· Δ pH. ··—··▲—·· Halbwertszeit der Umkehr der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
Zuckergehalt des Preßaftes: a) 4,2 mM Glucose, 2,4 mM Fructose, 17,1 mM Saccharose, 0,2 mM Raffinose. b) 11 mM Glucose, 6 mM Fructose, 77,9 mM Saccharose, 1,3 mM Raffinose. In beiden Teilen der Abbildung sind links die Meßwerte der 0 C-Kontrollen 6 Stunden nach der Isolierung aus dem Homogenat aufgeführt, die die Alterung der Proben über den Versuchszeitraum (unabhängig vom Einfluß der Zellinhaltsstoffe) wiedergeben. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

Wurden dem Homogenisationsmedium 50% Zellsaft zugemischt und die Thylakoide in diesem Gemisch bis zu -40 C gefroren, so ist sowohl bei ungehärtetem wie bei gehärtetem Material eine mit sinkender Temperatur fortschreitende Schädigung aller Parameter zu beobachten (Abb. 41). Diese Schädigung ist bei Thylakoiden aus ungehärteten Spinatblättern erheblich stärker als bei Thylakoiden aus gehärteten Spinatblättern. Wie ein Vergleich mit den zweiten Meßwerten der sofort isolierten Kontrollen nach Beendigung der Messung der gefrorenen Proben zeigt, entspricht die relativ geringe Inaktivierung der Thylakoide aus gehärteten Spinatblättern der Alterung der Proben während der Zeit des Kälteprogramms.

Beim ungehärteten Material dagegen liegen die Werte der gefrorenen Proben ab etwa -20 C für alle Parameter niedriger als die Werte der zweiten Messung der Kontrollen (die die Alterung wiedergeben). Dabei nehmen entkoppelter Elektronentransport und Photophosphorylierung in etwa gleichmäßig ab, die Halbwertszeit der Umkehr der lichtindzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz wird verkürzt und das ATP/$2e^-$-Verhältnis erniedrigt. Bei -40 C weisen sie noch ca 20% bis 30% der Kontrollwerte bei 0 C (erster Meßwert) auf. Dagegen fallen die Raten des gekoppelten Elektronentransports nur sehr geringfügig ab und verfügen bei -40 C noch über ca 80% der Kontrollrate, ebenfalls wird der Δ pH nur wenig beeinträchtigt.

An dem in Abb. 46b dargestellten Experiment sieht man auch ein Ergebnis, das man häufiger bei dieser Art von Experimenten findet: Die ungefrorenen Kontrollen weisen am Ende der Meßzeit niedrigere Raten auf als die gefrorenen Proben. Dies läßt sich so erklären, daß einerseits der Preßsaft während des Frierens nicht schädigend oder sogar schützend wirkt, andereseits Alterungsvorgänge infolge der niedrigeren Temperaturen verlangsamt sind.

Thylakoide, die in 30% Preßsaft analog zu den Experimenten in Abb. 38 bis 40 aufgenommen und anschließend bis -40 C gefroren wurden, zeigten nach dem Auftauen keine auf Preßsaft zurückzuführenden Inaktivierungen (nicht dargestellt). Wie Abb. 42 zeigt, führt auch eine Erhöhung der Preßsaftkonzentration auf 90% des Ansatzes (Ansatz ohne Verdünnungsmedium) zu keiner Schädigung während des Frierens. Die Ansätze froren zwischen -3 C und -5 C aus. Die geringfügige Inaktivierung, die bei der Photophosphorylierung oder dem entkoppelten Elektronentransport zu sehen ist, ist

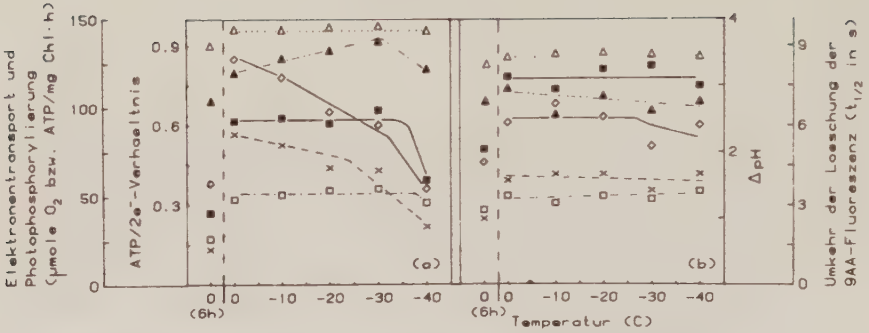

Abb. 42 a, b: Einfluß von Zellinhaltsstoffen auf die photosynthetischen Aktivitäten von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern während des Frierens (NaCl-Isolierung nach SANTARIUS UND ERNST, s. 4.2.1.1). Im Ansatz befanden sich 90% Preßsaft aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern. Die Ansätze wurden wie für Abb. 41 gefroren, die Verweiltemperatur des Kälteprogramms ist auf der Abszisse angegeben. Experimentelle Bedingungen wie für Abb. 33
•—·—□—·—• Elektronentransport unter photophosphorylierenden Bedingungen. ——■—— entkoppelter Elektronentransport. — — —✕— — — Photophosphorylierung.
——◇—— Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△····· Δ pH.
··—··▲—·· Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
Zuckergehalt des Preßsaftes: a) 4,8 mM Glucose, 3,3 mM Fructose, 6,4 mM Saccharose, 0,4 mM Raffinose.
b) 12 mM Glucose, 7,6 mM Fructose, 65,5 mM Saccharose, 0,5 mM Raffinose.
In beiden Teilen der Abbildung sind links die Meßwerte der 0 C-Kontrollen 6 Stunden nach Mischen des Ansatzes (Thylakoide + Zellsaft) aufgeführt, die die Alterung der Proben über den Versuchszeitraum (unabhängig vom Einfluß der Zellinhaltsstoffe) wiedergeben.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 3 Experimenten.

wohl überwiegend altersbedingt, wie die Werte der bei 0 C aufbewahrten Kontrollen am Ende der Messung zeigen (allerdings dürfte die Alterung bei 0 C schneller erfolgen als bei Temperaturen um -40 C). Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Abb. 41a zu stehen, wo bei 50% Saft im Homogenat eine Schädigung durch Frost erkennbar war. Allerdings besteht zwischen den Experimenten ein wesentlicher methodischer Unterschied. In Abb. 42 ist die Wirkung von präparierten Preßsaft auf gewaschene Thylakoide dargestellt, während es sich

in Abb. 41 um die Zugabe von präparierten Preßsaft zu einem Homogenat handelt. In diesem Fall kann es z.B. zu einem Zusammenspiel von Zellinhaltsstoffen mit Schadsubstanzen kommen, die bei der Präparation des Zellsaftes zurückgehalten werden (s.a. Diskussion).

Können bei 0 C nach langen Einwirkzeiten preßsaftbedingte Inaktivierungen beobachtet werden, so ist während des Frierens keine wesentliche Schädigung durch Zellinhaltsstoffe nachzuweisen - sowohl bei ungehärtetem als auch bei gehärtetem Material. Die Frosteinwirkung erhöht auch nicht die Empfindlichkeit der Thylakoidmembranen für die Einwirkung der Inhaltsstoffe während oder nach dem Auftauen. Thylakoide, die in Ansätzen mit 30% Zellsaft auf -40 C gefroren wurden und deren Aktivitätsverlust nach dem Auftauen wie bei den Thylakoiden zu Abb. 38 bis 40 über 10 Stunden bei 0 C verfolgt wurde, zeigen keine wesentliche Beschleunigung der Inaktivierung gegenüber den Thylakoiden in den Experimenten zu Abb.38 bis 40 (Daten nicht dargestellt.)

Die Vermutung, daß der Preßsaft während des Frierens schützende Wirkungen entfaltet, wird auch dadurch gestützt, daß bei den Proben, die mit 30% Preßsaft gefroren wurden, die für NaCl typische Entkopplung der Thylakoide während des Frierens ausblieb, obwohl die Proben mit 33 mM NaCl versetzt worden waren. Bemerkenswert ist auch, daß die Thylakoide in der Zellsaftsuspension Temperaturen bis zu -40 C ohne größere Schädigung überstehen können, obwohl sie in vivo je nach Härtung bereits zwischen -5 C bis -12 C geschädigt werden. Auch KÖPPEN (1979) schreibt, daß Thylakoide im In-Vitro-Experiment in Gegenwart von 50 bis 100 mM Saccharose Temperaturen bis -25 C ohne Schädigung überstehen, obwohl sie im gehärteten Blatt bei ähnlichen Zuckerkonzentrationen bereits bei -12 C voll inaktiviert sind.

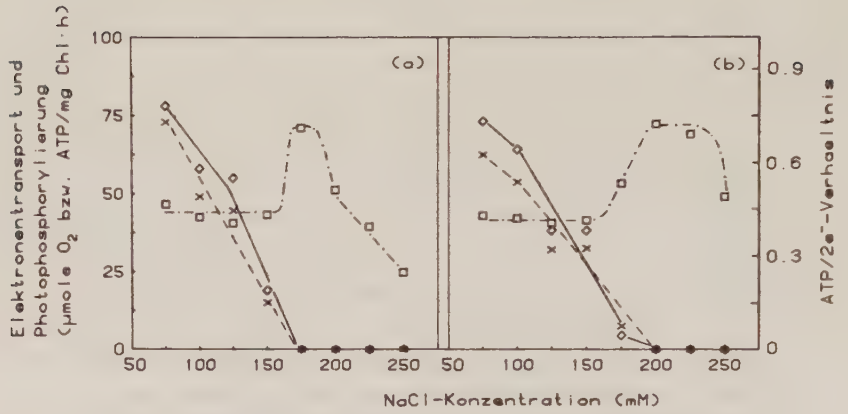

Abb. 43 A, B: Einfluß von Zellinhaltsstoffen auf die Frostschädigung von Thylakoiden aus ungehärteten Spinatblättern, die in vitro bei einer steigenden NaCl-Konzentration auf -20 C gefroren wurden (Kältebehandlung: Frieren mit 18 C/h 1 h Verweildauer bei -20 C, Auftauen mit 18 C/h). Der Ansatz bestand aus 30% Preßsaft ungehärteter (a) und gehärteter (b) Spinatblätter, 50% Verdünnungsmedium (Zuckergehalt wie im Preßsaft) und 10% einer NaCl-Lösung zunehmender Konzentration. Die NaCl-Konzentration ist auf der Abszisse angegeben, die Meßbedingungen entsprachen den Angaben in Abb. 33. — · — □ — · — Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen — — — × — — — Photophosphorylierung. ——◇—— Kopplung. ATP/2e⁻.
Zuckergehalt des Preßsaftes: a) 4,8 mM Glucose, 3,3 mM Fructose, 6,4 mM Saccharose, 0,4 mM Raffinose.
b) 12 mM Glucose, 7,6 mM Fructose, 65,5 mM Saccharose, 0,5 mM Raffinose
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten.

Um die schützende Wirkung des Preßsaftes zu untersuchen, wurden Thylakoide in einem Medium mit 30% Preßsaft bei unterschiedlichen NaCl-Konzentration auf -20 C gefroren. Die nach dem Auftauen gemessenen Aktivitäten der Thylakoide sind in Abb. 43 dargestellt. In Vorversuchen wurde erst ab 75 bis 100 mM NaCl im Ansatz eine Schädigung festgestellt. Es wurden für den Vergleich von Zellsaft aus gehärtetem und ungehärtetem Material immer Thylakoide aus der gleichen Präparation (ungehärteter Spinat) verwendet, so daß Unterschiede im Ergebnis nur durch den Preßsaft bedingt sein können.

Im Experiment der Abb. 43 ist eine mit steigender NaCl-Konzentration zunehmende Inaktivierung der Photophosphorylierung und Verringerung der Kopplung sichtbar. Diese Hemmungen sind bei der Serie mit Preßsaft aus gehärteten Spinatblättern nur wenig schwächer ausgeprägt: Die völlige Inaktivierung der Photophosphorylierung wird bei Preßsaft aus ungehärteten Spinatblättern in der Regel zwischen 150 bis 175 mM NaCl, bei Zellsaft aus gehärteten Blättern zwischen 200 bis 225 mM NaCl erreicht. Wie bei den früher geschilderten Ergebnissen der Frostschädigung in Gegenwart von NaCl (HEBER UND SANTARIUS, 1964; HEBER, 1967; s.a. 5.2.1) kommt es zur Entkopplung mit Stimulation des Elektronentransports. Diese Stimulation erfolgt versetzt zur Inaktivierung der Photophosphorylierung: Bei Preßsaft aus ungehärtetem Material ab ca 150 mM, bei Preßsaft aus gehärtetem Material ab 150 bis 175 mM. Ab Konzentrationen von 200 bzw. 225 mM kommt es dann zur Depression des Elektronentransports. Eine Inaktivierung des Elektronentransports durch hohe Salzkonzentrationen wurde auch von SANTARIUS UND HEBER (1970) und HEBER ET AL. (1973) in Experimenten ohne Zellsaft beobachtet.

In Abb. 31 konnte gezeigt werden, daß es ab 50 mM NaCl und 50 mM Saccharose ab -12 C zu einer vollständigen Entkopplung kommt. In den Experimenten zu Abb. 30 konnte gezeigt werden, daß bei 50 mM NaCl die Gegenwart von 80 mM Saccharose weitgehenden Schutz beim Frieren auf -10 C gewährleistet. In den Experimenten zu Abb. 43 wurden Zellsäfte verwendet, die über einen Gesamtzuckergehalt von 15 mM (ungehärtetes Material) bzw. 86 mM (gehärtets Material) verfügten. Obwohl dies z.T. erheblich unterhalb der zum Schutz notwendigen Zuckerkonzentrationen in Abb.30/31 liegt, tritt beim Frieren auf -20 C die Entkopplung im Mittel erst bei Salzkonzentrationen um ca 150 mM NaCl auf. Auf Grund der in Abb. 43

dargestellten Experimenten muß daher angenommen werden, daß im Zellsaft neben den Zuckern noch andere Schutzfaktoren (vielleicht Aminosäuren oder Proteine) eine Rolle spielen. Zwischen Preßsaft aus ungehärteten und gehärteten Blättern sind zwar Unterschiede in der Schutzwirkung feststellbar, überraschend ist aber der hohe Schutzgrad des Preßsaftes aus ungehärteten Blättern mit seiner relativ niedrigen Zuckerkonzentration.

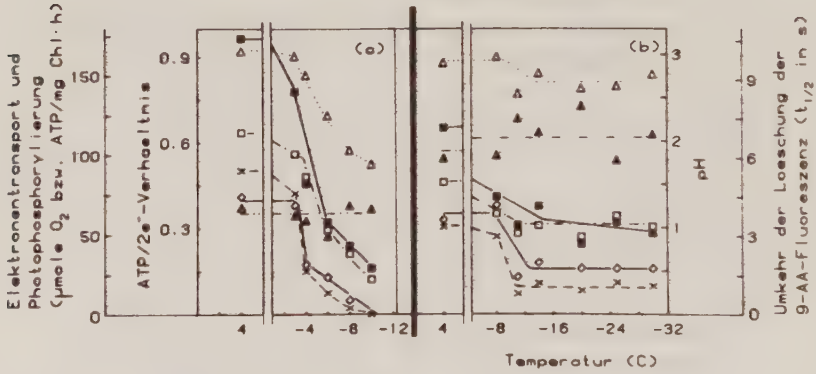

Abb. 44 A, B: Frostinaktivierung von Thylakoiden, die mit Seesand aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern im Mörser freigesetzt und im Homogenat vor der Isolierung (Sorbitisolierung, s. 4.2.1.5) einem Kälteprogramm (Frieren mit 12 C/h, 1 h Verweildauer bei der tiefsten Temperatur, Auftauen mit 12 C/h) unterzogen wurden. Auf der Abszisse ist die Verweiltemperatur des Kälteprogramms angegeben. Die weiteren experimentellen Bedingungen s. Abb. 33. ·—·—□—·—·—Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen. ———■——— entkoppelter Elektronentransport. — — —×— — — Photophosphorylierung. ———◇———Kopplung: ATP/2e⁻ ·····△·····△ pH. ··—··▲—··— Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl aus je 3 Experimenten.

Thylakoide, die ohne Isolierungsmedium mit Seesand im Mörser freigesetzt und im Homogenat vor der Isolierung gefroren wurden, zeigen (Abb. 44) bereits bei den ungefrorenen und sofort isolierten Kontrollen eine partielle Entkopplung (niedrige ATP/$2e^-$-Verhältnisse), wie man es auch bei der Schädigung der Thylakoide durch Preßsaft bei +20 C sieht (vgl. Abb. 33). Durch das Frieren kommt es zusätzlich zu einem annähernd parallelen Zusammenbruch von Elektronentransport (gekoppelt und entkoppelt) sowie der Restphosphorylierung. Der Δ pH wird wiederum erst bei niedrigeren Temperaturen betroffen. Dieser Vorgang entspricht weitgehend der Frostschädigung der Thylakoide in vivo (s. Abb. 3). Die Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals läßt sich in diesen Experimenten nicht bewerten, weil es bereits vor dem Frieren zu Entkopplungsvorgängen kommt (die Halbwertszeiten der ungefrorenen Kontrollen liegen zwischen 4 bis 6 Sekunden). Wie ein Vergleich mit den zweiten Meßwerten der Kontrollen nach Abschluß der Messung zeigt, handelt es sich überwiegend um Schädigungen durch die Frosteinwirkung und nicht um Alterungseffekte während der Zeit der Kältebehandlung (in Abb. 44 nicht dargestellt).

5.4. Frostschädigung isolierter Thylakoide durch Frieren in Gegenwart organischer Schadstoffe

Die kryotoxische Wirkung amphiphiler Substanzen wird in der Literatur als mögliche Ursache einer Membranalteration während des Frierens diskutiert. U.a. werden dabei die Aminosäure Phenylalanin, Phenylpyruvat und Caprylat als membranschädigend unter Frosteinwirkung beschrieben (Heber et al., 1971, 1973, 1979a). Es wurde über eine starke Hemmung des nichtzyklischen Elektronentransports und der Photophosphorylierung berichtet. Um die Membranschädigung durch amphiphile Substanzen bei Frosteinwirkung mit den Ergebnissen der Frosteinwirkung auf Spinatblätter (s. Klosson, 1978) vergleichen zu können, wurden diese Untersuchungen bei Verwendung einer ähnlichen Kältebehandlung und Messung derselben Parameter wie bei den In-Vivo-Experimenten wiederholt.

Wie Abb. 45 zeigt, konnten diese Befunde für Phenylalanin bei den hier gemessenen Parametern in dem bei Heber et al. (1971) beschriebenen Ausmaß nicht bestätigt werden. Der gekoppelte nichtzyklische Elektronentransport wird nur geringfügig oder gar nicht betroffen, ebensowenig der Δ pH und die Halbwertszeit der Umkehr der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung. Dagegen zeigen Photophosphorylierung und entkoppelter nichtzyklischer Elektronentransport ab 25 bis 35 mM Phenylalanin im Ansatz den Beginn einer Inaktivierung nach dem Frieren, die bei 65 mM (nahe der Löslichkeitsgrenze von Phenylalanin in Wasser) etwa 50% erreicht. Wie unten bei den Untersuchungen mit Caprylat noch deutlicher zu sehen sein wird, kann es auch bei Phenylalanin vor dem Abfall zu einer geringgradigen Erhöhung der Phosphorylierungsrate kommen. Die gleichbleibenden Werte des gekoppelten Elektronentransportes könnten das Ergebnis sich gegenseitig aufhebender Entkopplungs-und Schadeffekte sein.

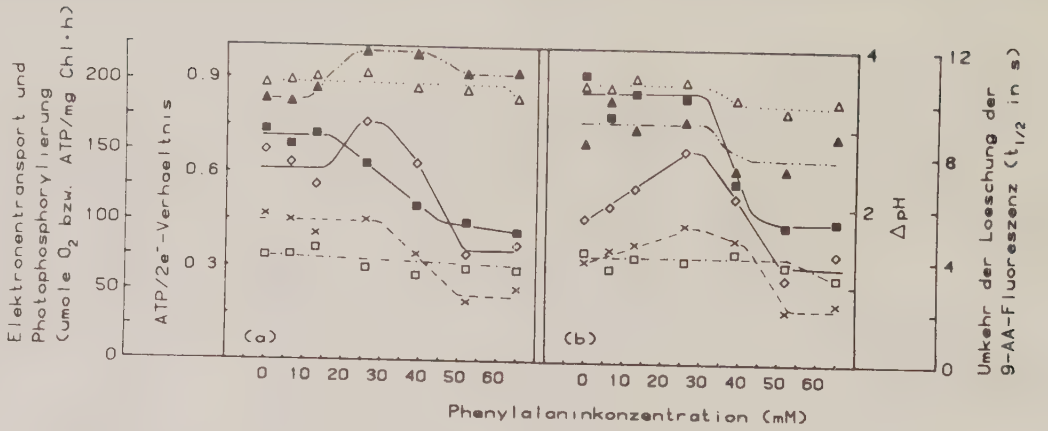

Abb. 45 A, B: Wirkung von Phenylalanin bei der Frostbehandlung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern. Die Thylakoide wurden im NaCl-Medium nach SANTARIUS UND ERNST (s. 4.2.1.1) isoliert und in Gegenwart von 0,1M Saccharose bei verschiedenen Phenylalaninkonzentration auf -20 C gefroren (Kältebehandlung: Frieren mit 18 C/h, 1 h Verweildauer bei-20 C, Auftauen mit 18 C/h). Auf der Abszisse ist die Phenylalaninkonzentration angegeben. Experimentelle Bedingungen wie Abb. 33.
—·—□—·—·—Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen. ———■——— entkoppelter Elektronentransport.
— — —×— — — Photophosphorylierung. ———◇——— Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△·····Δ pH. —··—▲··—·· Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten

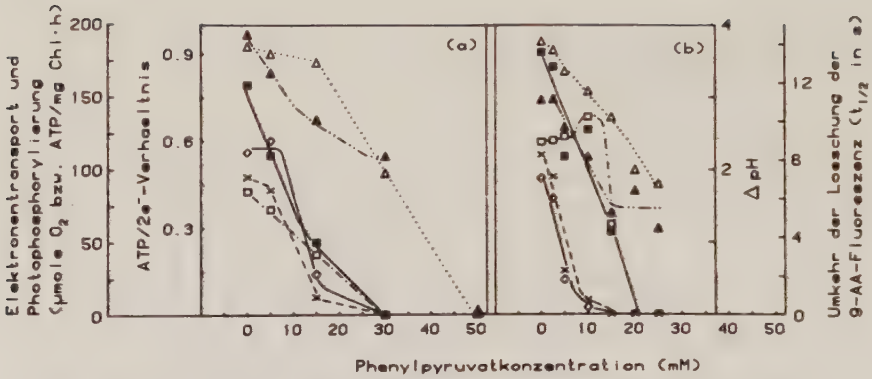

Abb. 46 A, B: Wirkung von Phenylpyruvat bei der Frostbehandlung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern. Die Thylakoide wurden in Gegenwart von 0.1M Saccharose bei verschiedenen Phenylpyruvatkonzentrationen auf -20 C gefroren. (Isolierung der Thylakoide und Kältebehandlung s. Abb. 45). Auf der Abszisse ist die Phenylpyruvatkonzentration angegeben. Experimentelle Bedingungen der Messung wie in Abb. 33.
·—·—□—·—Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen. ———■———entkoppelter Elektronentransport.
— — —×— — —Photophosphorylierung. ———◇———
Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△·····Δ pH. —··—▲··—··
Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz.
Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten

Phenylpyruvat, ein Metabolit des Phenylalanins, ist von früheren Untersuchungen (HEBER ET AL., 1973, 1979A) als frostschädigend bezüglich des Elektronentransports und der Photophosphorylierung bekannt. Diese Ergebnisse können für die hier gemessenen Parameter weitgehend bestätigt werden (Abb. 46). Bereits bei niedrigen Konzentrationen von Phenylpyruvat (unter 5 mM) beginnt eine Inaktivierung der Photophosphorylierung und des entkoppelten Elektronentransports, deren Werte bei 20 bis 30 mM Phenylpyruvat auf Null absinken. Die Verringerung des Δ pH und die Verkürzung der Halbwertszeit

der Umkehr der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz beginnen ebenfalls schon bei Konzentrationen um 5 mM, verlaufen aber weniger steil. Der gekoppelte nichtzyklische Elektronentransport verhält sich in verschiedenen Experimenten unterschiedlich. Entweder sinkt er kontinuierlich mit steigender Phenylpyruvat-Konzentration ab (wobei im Gegensatz zu den In-Vivo-Frostschädigungen eine 100%ige Hemmung erreicht wird), oder es kommt kurz vor Einsetzen der Inaktivierung noch zu einer Stimulierung. D.h. im Gegensatz zum Frieren in vivo sind hier auch entkoppelnde Effekte sichtbar; die Photophosphorylierung fällt stärker ab als der Elektronentransport. Die erniedrigte Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals weist auf ein Protonenleak in der Membran hin. Immer kommt es aber mindestens ab Konzentrationen von 15 mM Phenylpyruvat im Versuchsansatz auch zu einem weitgehenden Zusammenbruch des Elektronentransportes.

Nach Frosteinwirkung in Gegenwart von Caprylat beobachteten HEBER ET AL. (1979A) bei Konzentrationen, die noch nicht schädigend wirken, eine Stimulierung der ATP-Synthese, die damals nicht erklärbar war. Diese Ergebnisse werden in Abb. 47 bestätigt. Bei niedrigen Konzentrationen um 3 bis 5 mM Caprylat kommt es teils zu einer Stimulation, teils zu keinerlei Veränderungen der Parameter. Dabei fallen die starke Zunahme der Photophosphorylierung und die Verlängerung der Halbwertszeit der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung auf. Ursache für die Stimulierung der Photophosphorylierung und die Zunahme des ATP/$2e^-$-Verhältnisses scheint eine verminderte Durchlässigkeit der Membran für H^+-Ionen zu sein. Darauf deutet auch die Verlängerung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung im gleichen Konzentrationsbereich hin. GIERSCH (1982) berichtet, daß nach der Zugabe geringer Konzentrationen von chemischen Entkopplern ebenfalls eine Verbesserung des

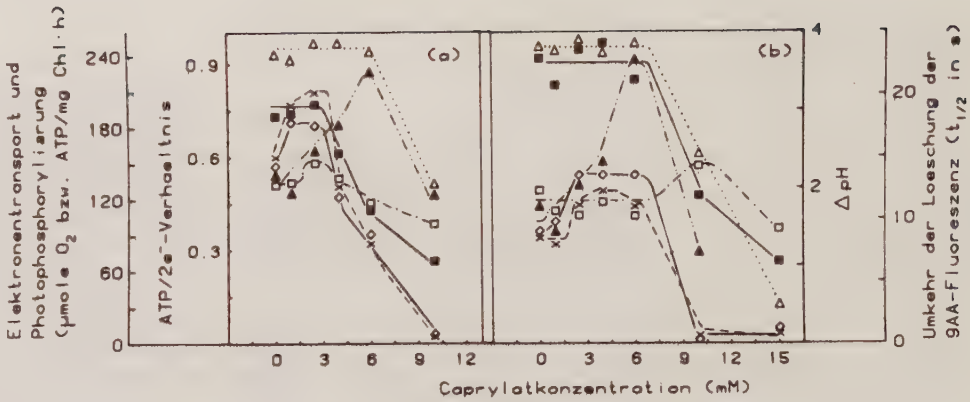

Abb. 47 A, B: Wirkung von Caprylat bei der Kältebehandlung von Thylakoiden aus ungehärteten (a) und gehärteten (b) Spinatblättern. Die Thylakoide wurden in Gegenwart von 0,1M Saccharose und verschiedenen Caprylatkonzentrationen auf -20 C gefroren (Isolierung und Kältebehandlung s. Abb. 45). Auf der Abszisse ist die Caprylatkonzentration angegeben. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 33. —·—·□—·—· Elektronentransport unter phosphorylierenden Bedingungen, ———■——— entkoppelter Elektronentransport. – – –×– – – Photophosphorylierung. ———◇——— Kopplung: ATP/2e⁻. ·····△····· Δ pH. —··—▲··—·· Halbwertszeit der Umkehr der lichtinduzierten Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz. Es handelt sich um die Darstellung repräsentativer Experimente aus einer Auswahl von je 2 Experimenten

ATP/$2e^-$-Verhältnisses eintritt. Diese Experimente sind aber nicht ganz mit den hier dargestellten Ergebnissen vergleichbar, da von GIERSCH die Zunahme der Phosphorylierung bei gleichzeitiger Abnahme des Δ pH beobachtet wurde. Es wäre aber denkbar, daß Caprylat während des Frierens in die Membran eindringt und Leckstellen der Membran verschließt, so daß der passive Ausfluß der H^+-Ionen vermindert wird.

Daß die Verlängerung der Halbwertszeit der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz-Löschung z.T. in den Bereich des Zusammenbruchs der Photophosphorylierung fällt, deutet an, daß die Inaktivierung der Phosphorylierung nicht nur durch eine verminderte Fähigkeit der Thylakoide zum Aufbau des Protonengradienten verursacht sein kann. Vielmehr könnte die Ursache in einer Verminderung der Elektronentransportkapazität liegen. In Gegenwart höherer Caprylatkonzentrationen kommt es bei allen Parametern zu einer zunehmenden Inaktivierung. Die Photophosphorylierung ist in der Regel bei 10 mM, der Aufbau des Δ pH bei etwa 15 mM Caprylat vollständig gehemmt. Gekoppelter und entkoppelter Elektronentransport zeigen bei 15 mM noch ca 80% bis 90% bzw. 20% bis 40% der Kontrollraten.

Alle durch die geprüften amphiphilen Substanzen verursachten Schadensmuster stimmen nur in Teilaspekten mit der Frostschädigung in vivo überein bzw. zeigen zusätzliche Effekte, wie sie bei der In-Vivo-Schädigung nicht gesehen werden. Auch hier fand sich keine geringere Empfindlichkeit bei Thylakoiden aus gehärteten Spinatblättern.

6. Diskussion

Ein Problem bei der Darstellung der Ergebnisse war die große Streubreite der Daten - sowohl unter den einzelnen Meßpunkten eines Experiments als auch zwischen mehreren Experimenten des gleichen Typs. Die Streuung ist in erster Linie auf die trotz Gewächshaus- und Klimakammer-Kultivierung vorhandene Variabilität des Pflanzenmaterials zurückzuführen. Auch innerhalb der Blattproben einer Anzucht zeigten die Blätter etwas unterschiedliche Frostempfindlichkeiten (vergl. hierzu auch 6.6). So war es möglich, daß innerhalb einer Probe mit überwiegend teilgeschädigten Blättern auch vereinzelt vollgeschädigte Blätter vorhanden waren, während andere Blätter äußerlich noch intakt zu sein schienen. Es wurden dann immer die Blätter der Probe ausgewählt, die nach dem Ausmaß der Infiltration einen mittleren Schädigungsgrad aufwiesen. Trotz der breiten Streuung können die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse - aufgrund mehrfacher Wiederholung - als gesichert angesehen werden.

6.1 Mögliche Ursachen der Inaktivierung der Photosynthese nach der Frostbehandlung von Blättern

Als Orte der Schädigung standen bisher die Membransysteme im Vordergrund (s.a. Lyons et al., 1979). Thylakoide (Heber et al., 1979a) und Mitochondrien (Thebud und Santarius, 1981a und b) werden durch Frieren und Auftauen rasch geschädigt, wenn die Konzentration von Frostschutzstoffen unzureichend ist. Dies ist in vitro eingehend untersucht worden (s. Einleitung).

Diese Arbeit bestätigt die in der Literatur bisher bekannten Unterschiede der Frostschädigung zwischen In-Vitro- und In-Vivo-Systemen (HEBER ET AL., 1973; THEBUD UND SANTARIUS, 1981A; KLOSSON, 1978; KLOSSON UND KRAUSE, 1981A UND B). In vivo ist der Schaden sehr komplex und in wichtigen Punkten nicht deckungsgleich mit der Schädigung bei Experimenten in vitro. Während nach der Kältebehandlung von isolierten Thylakoiden primär der Elektronentransport von der Photophosphorylierung entkoppelt wird, werden in vivo alle gemessenen photosynthetischen Reaktionen der Thylakoide relativ gleichmäßig von der Frostschädigung betroffen. Inbesondere ist die Hemmung des Elektronentransports auffällig. Wurde die isolierte Hemmung der Photophosphorylierung bei kältebehandelten Thylakoiden auf eine erhöhte H^+-Permeabilität der Thylakoidmembran zurückgeführt (HEBER, 1967 UND 1968; JENSEN, 1981), so ließ sich bei Thylakoiden, die in situ durch Frost geschädigt worden waren, die Inaktivierung der Photophosphorylierung nicht mit einer erhöhten H^+-Permeabilität erklären.

In diesem Zusammenhang muß auch eine früher bereits diskutierte Frage unter einem neuen Gesichtspunkt wieder aufgenommen werden (s.a. HEBER, 1968): Sind die Thylakoide Ort der primären Frostschädigung oder stellen sie nur ein Modell für die Frostschädigung der Pflanzen dar? Schon in früheren Arbeiten (s.a. KLOSSON, 1978; KLOSSON UND KRAUSE, 1981A) war in Frage gestellt worden, ob die Thylakoidmembran der Ort der Primärschädigung ist. TOWILL UND MAZUR (1976) geben an, daß man je nachdem, ob Pflanzen, Zellen oder Organellen einer Kältebehandlung unterworfen werden, verschiedene Ergebnisse findet. Sie äußern die Vermutung, daß Organellen stabiler gegen Frosteinwirkung sind als ganze Zellen. STEPONKUS ET AL.

(1977) halten es aufgrund ihrer Ergebnisse ebenfalls für unwahrscheinlich, daß der Primärschaden durch Frost im Chloroplasten erfolgt und sehen in den Thylakoiden nur ein Membranmodell für Frostschaden, Schutzstoffwirkung und Frosthärtung.

In dieser Arbeit können Hinweise darauf gegeben werden, daß die Aktivitäten der Thylakoidmembran etwas weniger frostempfindlich sind als die photosynthetische CO_2-Fixierung. Dies zeigt sich besonders deutlich bei gehärteten Pflanzen (für Spinat s. Tab.II). Auch das Atmungssystem erwies sich als weniger empfindlich gegen die Frosteinwirkung als die photosynthetische CO_2-Fixierung.

Die relativ größere Unempfindlichkeit der Thylakoide in situ zeigt sich deutlich in der Zunahme der Signale der Fluoreszenzlöschung und der apparenten Absorption im Bereich der Teilschädigung der CO_2-Fixierung. KRAUSE (1973) zeigte, daß sowohl das Maximum der Fluoreszenzlöschung wie die Emission im Zustand des Steady-State u.a. durch die CO_2-fixierenden Aktivitäten des Blattes mitbestimmt werden. In ungeschädigten Kontrollblättern ist die Fluoreszenzlöschung bei ablaufender CO_2-Fixierung stark vermindert. Die Löschung ist verstärkt (oder bleibt bei Teilschädigung zumindestens konstant), wenn die CO_2-Fixierung durch die Frostbehandlung z.T. inaktiviert wird. In Abwesenheit von CO_2 ist das Signal der Fluoreszenzlöschung von ungeschädigten Blättern groß und nimmt mit zunehmender Schädigung ab. Nach VERNOTTE ET AL. (1981), BRIANTAIS ET AL. (1979), UND KRAUSE ET AL. (1981A UND 1982) wird die Fluoreszenzlöschung in Gegenwart von CO_2 überwiegend durch den photosynthetischen Elektronentransport und den lichtinduzierten Protonengradienten über die Thylakoidmembran bestimmt.

Die Verminderung der Löschung in Verbindung mit dem Frostschaden gibt die Inaktivierung des phototsynthetischen Apparats der Thylakoide wieder (insbesondere Schädigung des Elektronentransportsystems und Verringerung des Protonengradienten). Der intermediäre Anstieg der Löschung in Gegenwart von CO_2 dagegen zeigt, daß die Inaktivierung der CO_2-Fixierung an einem Punkt eintritt, an dem der energiekonservierende Apparat der Photosynthese noch funktionsfähig ist.

Die langsame Änderung der apparenten Absorption bei 535 nm wird wesentlich durch den Aufbau des Δ pH an der Thylakoidmembran bei Belichtung und seinem Zusammenbruch im Dunkeln verursacht (HEBER, 1969; KRAUSE, 1973; KRAUSE, 1974; KÖSTER UND HEBER, 1982). Bei ungefrorenen Kontrollen ist in Gegenwart von CO_2 das Lichtstreuungssignal klein, weil der Protonengradient durch stetige Synthese und Verbrauch von ATP in der CO_2-Fixierung auf einem niedrigen Niveau gehalten wird (s.a. KRAUSE ET AL., 1978). Teilschädigung der Blätter ist meist charakterisiert durch ein vergrössertes Lichtstreuungssignal in Gegenwart von CO_2 und ein verkleinertes Signal in Abwesenheit von CO_2. Diese Veränderungen fallen mit der partiellen Inaktivierung der CO_2-Fixierung zusammen.

Als weiterer Indikator der Thylakoidenergetisierung dient die schnelle Absorptionsänderung (Maximum bei 520 nm). Sie beruht auf einer Absorptionsverschiebung der Carotinoide, die durch den Aufbau des Membranpotentials verursacht wird (JUNGE, 1977). Auch dieses Signal zeigte im Verlauf der Frostschädigung ähnliche Änderungen wie die Signale der Chlorophyll-a-Fluoreszenz und der Lichtstreuung.

Dieses Schadmuster der biophysikalischen Signale findet sich nicht nur bei Spinat, sondern mehr oder weniger deutlich bei allen untersuchten krautigen Pflanzen (mit Ausnahme von gehärteten Blättern von *Tetragonia*). Dort, wo eine Zunahme der Signalgröße im Bereich der Teilschädigung nicht zu sehen ist, ist zumindest die Verringerung der Signalgröße gegenüber der Inaktivierung der Photosynthese verzögert. Auf Grund dieser Befunde ist es denkbar, daß bei den krautigen Pflanzen die Frostschädigung nach einem generellen Mechanismus erfolgt. Etwas anders scheint die durch Frost induzierte Schädigung bei der holzigen immergrünen Pflanze *Hedera Helix L.* (Efeu) zu verlaufen. Auf diese Unterschiede wird noch eingegangen werden.

Die Stimulation der biophysikalischen Signale in teilgeschädigten Blättern läßt sich als Ergebnis eines "Energiestaus" interpretieren, wie er durch eine Schädigung der CO_2-Fixierung bei noch intaktem energiekonservierenden System entstehen kann. Diese Annahme wird durch den verzögerten Abfall des ATP-Spiegels in den Blättern im Vergleich zur Hemmung der photosynthetischen CO_2-Fixierung nach der Frostbehandlung bestätigt (Abb. 9): Wenn die CO_2-Fixierung bereits deutlich vermindert ist, bleibt der ATP-Spiegel im Licht noch unvermindert.

Die Hemmung der CO_2-Fixierung ist demnach das erste Zeichen des Frostschadens bei den untersuchten krautigen Pflanzen, der Mechanismus dieser Hemmung ist noch unbekannt. Die Photosynthese scheint allgemein der empfindlichste Parameter des Blattgewebes zu sein, denn auch nach Einwirkung anderer Streßfaktoren wie z.B. Hitze (THEBUD UND SANTARIUS, 1982) und osmotischer Streß (KAISER UND HEBER, 1981; KAISER ET AL., 1981) wurde als erstes Zeichen der Schädigung eine Hemmung der Photosynthese beobachtet.

Die Temperatur, bei der spontane Eisbildung im Blatt eintritt, wird durch die Härtung nicht erniedrigt, wohl aber die Temperatur, bei der die Schädigung einsetzt. Gefrorene frostgehärtete Blätter aller in dieser Arbeit untersuchten Species (*Spinacia*, *Viola*, *Tetragonia*, *Triticum* und *Hedera*) zeigen nach dem Wiederauftauen annähernd gleiche Raten der photosynthetischen CO_2-Fixierung wie die ungefrorenen Kontrollen, solange die Grenztemperatur der Schädigung nicht erreicht wurde, obwohl es in den Blättern zur Eisbildung gekommen ist. Ein frostinduzierter andauernder Verschluß der Stomata nach dem Auftauen mit dem daraus folgenden CO_2-Mangel, wie von LARCHER (1983) postuliert wurde, ist nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich nicht die Ursache für die frostbedingte Verringerung der Photosyntheseraten. Eine Abnahme der Transpiration tritt durch die Frostbehandlung bei Spinatblättern nicht ein. Vielmehr nimmt die Transpiration mit zunehmender Hemmung der Photosynthese noch zu, weil die Zwischenzellräume des geschädigten Gewebes mit Wasser gefüllt sind, das während des Auftauens nicht resorbiert wurde. Durch die Infiltration könnte jedoch die CO_2-Diffusion zu den Chloroplasten verlangsamt und damit die CO_2-Fixierung gehemmt werden (LARCHER, 1983). Dies dürfte aber nur als Sekundäreffekt anzusehen sein, dem eine schwere Denaturierung der Zellmembranen (Plasmalemma und Tonoplast) vorausgehen muß. Eine geringe Depression der photosynthetischen CO_2-Fixierung ist oft schon erkennbar, bevor eine deutliche Infiltration der Blätter sichtbar wird. Die Behinderung der CO_2-Diffusion durch die Infiltration dürfte nur in schwer geschädigten Gewebestellen eine Rolle spielen.

Neuere Untersuchungen an isolierten Protoplasten (S. RUMICH, unveröffentlicht), bei denen derartige Diffusionseffekte nicht auftreten können, zeigen ebenfalls eine deutlich höhere Empfindlichkeit der CO_2-Fixierung im Vergleich zu den photosynthetischen Aktivitäten der Thylakoide. Insgesamt sprechen die z.Z. vorliegenden Daten mehr für eine primäre Membranschädigung,die am Tonoplasten und am Plasmalemma sowie evtl. an der Chloroplastenhülle, nicht aber an den Thylakoiden einsetzt.

Der Verlust der Membransemipermeabilität, wie er z.B. von SENSER UND BECK (1977) postuliert wird, und der Zusammenbruch der Kompartimentierung im besonderen, können zu einer Inaktivierung der CO_2-Fixierung im Calvin-Zyklus führen, während die Thylakoidreaktionen weniger betroffen werden. Darauf deuten auch die weiter unten diskutierten Ergebnisse der Experimente hin, die zeigen, daß Thylakoide durch Zellsaft relativ wenig geschädigt werden.

Denkbar wäre z.B., daß die Lichtaktivierung bestimmter Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus wie z.B. der Ribulose-5-Phosphat-Kinase, der Sedoheptulose-Bisphosphatase oder der Fructose-Bisphosphatase unterbleibt, wenn die lichtbedingte Alkalisierung des Stromas ausbleibt (LAING ET AL., 1981). Eine Hemmung der Lichtaktivierung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase wurde von einer anderen ökologischen Streßart, der Hitze, bereits berichtet (WEIS, 1981).

Hierzu paßt auch, daß während der Frostbehandlung ganzer Blätter die Chloroplastenhülle geschädigt oder zerstört wird (KLOSSON, 1978; KLOSSON UND KRAUSE, 1981A). Die Integrität der Chloroplastenhülle ist eine wichtige Voraussetzung für die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromas. Zusätzlich käme es durch den Zusammenbruch der Kompartimentierung zu einer Vermischung der einzelnen Reaktionsräume der Zelle.

Möglich ist aber auch eine direkte Denaturierung der Enzyme des Calvin-Zyklus durch die frostbedingte Entwässerung der Zelle. Für eine derartige Inaktivierung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase sprechen In-Vitro-Experimente von HUNER UND CARTER (1982) sowie HUNER ET AL. (1982). Dieses Enzym, das durch einen sehr komplexen Mechanismus reguliert wird (LORIMER, 1981), gilt als besonders empfindlich für äußere Störeinflüße. Unbekannt ist ferner, ob die Inaktivierung dieses Enzyms und nicht anderer Enzyme (z.B. der Ribulose-5-Phosphat-Kinase) ausschlaggebend für die hohe Frostempfindlichkeit der Photosynthese ist. Andererseits sollte aber nicht unerwähnt bleiben, daß in einer Reihe von Arbeiten (s.z.B. ULLRICH UND HEBER, 1961; SANTARIUS, 1969; HEBER, 1968) eine direkte Frostdenaturierung löslicher Enzyme nicht nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen es als notwendig erscheinen, die Frostschädigung künftig am Gesamtsystem (z.B. Protoplasten) statt an Thylakoiden zu untersuchen, da bei krautigen Pflanzen vermutlich die Thylakoide nicht der Ort der Primärschädigung durch Frost sind und außerdem die Frostschädigung der Thylakoide in vivo anders verläuft als im isolierten In-Vitro-System.

Bei holzigen Pflanzen erfolgen sowohl der Ablauf der Frosthärtung (s. SIMINOVITCH, 1981) wie auch der Verlauf der Frostschädigung anders als bei krautigen Pflanzen. In dieser Arbeit wird dies durch Untersuchungen der immergrünen Pflanze *Hedera helix L.* bestätigt. So ist bei Frostbehandlung gehärteter Efeublätter die photosynthetische CO_2-Fixierung nicht der empfindlichste Parameter. Die Photosyntheseraten liegen nur leicht oberhalb der Atmungsraten der Blätter. Ähnlich erniedrigte Photosyntheseraten sind auch von gehärteten Fichtennadeln bekannt (SENSER UND BECK, 1977).

Auch die Atmungsrate ist bei Efeu im Vergleich zu den krautigen Pflanzen erniedrigt. Bei den biophysikalischen Signalen konnte kein CO_2-Effekt auf die Signalgröße beobachtet werden. Wie in den krautigen Pflanzen ist jedoch die Photosynthese frostempfindlicher als die Atmung. Es kann angenommen werden, daß bei holzigen Pflanzen der Härtungsvorgang zu einer Reduktion der Kapazität des Kohlenstoffmetabolismus oder der Thylakoidaktivität führt. Eine mögliche Ursache hierfür nennen LARCHER UND BAUER (1981): Sie beobachteten einen permanenten Stomataschluß in frostgehärteten Blättern holziger Pflanzen im Winter.

Die biophysikalischen Signale, die die Energieaufnahme und -konservierung widerspiegeln, werden bei Efeu mit abnehmender Verweiltemperatur der Kältebehandlung über einen breiten Temperaturbereich langsam erniedrigt. Die Erniedrigung beginnt bereits vor Sichtbarwerden einer Schädigung der photosynthetischen CO_2-Fixierung. Auch die T_{50}-Werte der biophysikalischen Signale liegen höher als die T_{50}-Werte der Photosynthese. Diese Unterschiede müssen aber sehr kritisch bewertet werden, denn die niedrigen Photosyntheseraten können die Ursache für die geringe Frostsensivität der CO_2-Assimilation im Vergleich zur Frostempfindlichkeit des energiekonservierenden Systems der Thylakoide sein.

Das Ausmaß der Schädigung der Blätter erwies sich als weitgehend abhängig von der Temperatur des Kälteprogramms und dem Härtungsgrad der Blätter. Zum Einfluß der Temperatur sind ähnliche Beobachtungen auch von LARCHER (1969) gemacht worden. Innerhalb des Rahmens der in der Natur normalerweise auftretenden Variationen von Gefrier- und Auftaugeschwindigkeiten wurde keine wesentliche Veränderung im Schadmuster oder im Grad

der Frostschädigung beobachtet. Auch eine unterschiedliche Verweildauer bei der Minimumtemperatur (1 bis 8 h) hatte keinen Einfluß auf den Grad der Schädigung. Diese In-Vivo-Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der In-Vitro-Experimente von SANTARIUS UND GIERSCH (1983), bei denen diese Parameter der Kältebehandlung einen Einfluß auf das Ausmaß der Membraninaktivierung gefrorener Thylakoide haben. Dies zeigt erneut, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, in vitro erhaltene Ergebnisse auf das In-Vivo-System zu übertragen.

6.2. DIE BEDEUTUNG VON ZELLINHALTSSTOFFEN FÜR DIE INAKTIVIERUNG DER THYLAKOIDMEMBRANEN

Bei stärkerer Frostschädigung der Blätter kommt es neben der Inaktivierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung auch stets zu einer mehr oder weniger starken Inaktivierung der Thylakoide. Der Schadverlauf wurde bereits in der Diplomarbeit (KLOSSON, 1978) untersucht, hier aber durch zusätzliche Experimente einer Klärung näher gebracht. Unklar war vor allem, wodurch die Frostschädigung der Thylakoide in vivo zustande kommt: Ob durch eine Primärschädigung des Plasmalemmas, des Tonoplasten und der Chloroplastenhülle (s. hierzu auch 6.1) und damit sekundär aufgrund dieser Membranschädigungen oder durch einen direkten Effekt auf die Thylakoide.

Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist, daß der Frostschaden an der Thylakoidmembran während des langsamen Auftauvorganges verstärkt werden kann. Dies gilt zumindest für den kritischen Bereich der Verweiltemperatur, die nach dem Tauen zu einer teilweisen Gewebsschädigung führt. Die Ergebnisse dieser

Experimente (s. Abb. 12 und 13) können noch nicht vollständig erklärt werden (vergl. a. 6.3). Denkbar ist, daß beim Frieren durch Einwirkung von konzentrierten "membrantoxischen" Substanzen (HEBER, 1968), durch eine frostbedingte Umlagerung der Membrankomponenten oder andere physikalische Schadeffekte (s. 6.3) die Permeabilitätseigenschaften von Membranen wie Tonoplast oder Chloroplastenhülle so verändert werden, daß während des Auftauens schädigende Substanzen freigesetzt werden und an die Thylakoidmembranen gelangen können. Die chemische Natur derartiger "membrantoxischer Substanzen" ist noch weitgehend ungeklärt. Einige Autoren (s. SENSER UND BECK, 1977) postulieren Vakuoleninhaltsstoffe als schädigende Agentien, die während des Frierens oder nach dem Tauen ihre Wirkung entfalten sollen (s.a.u.). In eine ähnliche Richtung weist auch die Mitteilung von TOWILL UND MAZUR (1976), daß junge Pflanzenzellen wegen ihrer geringeren Vakuolengröße eine geringere Frostempfindlichkeit besitzen sollen, sowie die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, daß die Erholung frostgeschädigter Pflanzen von ungeschädigten jungen Blättern ausgeht (s.a. 6.6).

Der Hauptunterschied zwischen der in vitro und in vivo beobachteten Schädigung der Thylakoide ist die Hemmung des Elektronentransports in Thylakoiden, die in situ gefroren und nach dem Tauen aus dem geschädigten Gewebe isoliert wurden. Dagegen ist für die Frostschädigung in vitro eine primäre Entkopplung des Elektronentransports von der Photophosphorylierung und damit verbunden eine Stimulation des Elektronentransports charakteristisch. Eine Entkopplung wird in vivo primär nicht gesehen, erst bei sehr starker Schädigung des Blattes ist die verbleibende Restaktivität des Elektronentransports nicht mehr mit der Phosphorylierung verbunden (s.a. KLOSSON, 1978).

Innerhalb der Meßgenauigkeit wurde die Photophosphorylierung weitgehend parallel zum Elektronentransport gehemmt, d.h. die verringerte Photophosphorylierung dürfte auf den verminderten Elektronentransport zurückgehen. Daß es sich um eine Verminderung der Kapazität des Elektronentransports handeln muß, zeigt die Abnahme der Raten des mit NH_4Cl entkoppelten Elektronentransports mit zunehmender Frostschädigung. Die Hemmung des Elektronentransports ist überwiegend eine Folge der Schädigung der Wasserspaltungsreaktion. Diese Reaktion scheint besonders streßempfindlich zu sein, da sie bei Hitzestreß ebenfalls bevorzugt geschädigt wird (SANTARIUS ET AL., 1979). Allerdings sind auch die Aktivitäten von Photosystem II (ohne Wasserspaltungssystem) und von Photosystem I vermindert. Demnach kann in vivo eine erhöhte H^+-Permeabilität der Thylakoidmembran als Ursache der Hemmung der Photophosphorylierung nicht angenommen werden (s.a.Abb. 9 zur Halbwertzeit der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz), wie dies in vitro möglich ist (s. HEBER, 1968). In vivo nimmt mit dem geringer werdenden Elektronentransport auch die H^+-Transportrate durch die Membran (und damit die Phosphorylierungsrate) ab. Unter nichtphosphorylierenden Bedingungen wie sie für die Messungen angewandt wurden, erreicht der Δ pH auch bei einem geringen Elektronentransport noch relativ hohe Werte. Daraus erklärt sich die relative Unempfindlichkeit des Δ pH gegenüber Frosteinflüssen in den dargestellten Experimenten.

Diese Ergebnisse stehen in wichtigen Punkten deutlich im Gegensatz zu den Effekten, die man durch Frieren von Thylakoiden in vitro in Gegenwart von hohen Konzentrationen anorganischer Salze sieht. (HEBER ET AL., 1973; HEBER, 1968; HEBER ET AL., 1979A; s.a. Abb. 30 bis 32) In Gegenwart einer geringen Konzentration von kryoprotektiven Substanzen erfolgt durch Salze eine Entkopplung

in Verbindung mit ansteigenden Raten des Elektronentransports, abfallendem Δ pH und verkürzten Halbwertszeiten der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz. Auch bei voller Hemmung der Photophosphorylierung erfolgt oft keine Hemmung des Elektronentransports.

Methodische Unterschiede können als Ursache für diese Inkohärenz zwischen den Ergebnissen der Experimente in vitro und in vivo weitgehend ausgeschlossen werden. Schon in der Diplomarbeit (KLOSSON, 1978) konnte gezeigt werden, daß der In-Vivo-Schaden der Thylakoide bereits während des Frier-Auftau-Vorgangs im Blatt gesetzt wird (s.a. biophysikalische Signale) und nicht das Ergebnis einer artifiziellen Schädigung vorsensibilisierter Thylakoide durch die Isolierungsmethode darstellt. Die hier dargestellten Unterschiede der Frosteinwirkung in vivo und in vitro legen den Schluß nahe, daß die Thylakoidinaktivierung durch das Frieren in vivo nicht primär durch schädigende Effekte der ansteigenden Elektrolytkonzentration infolge der extrazellulären Eisbildung in der Zelle erfolgt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den In-Vivo-und den In-Vitro-Experimenten ist, daß den Thylakoiden, die in vitro gefroren wurden, die natürliche Zellumgebung fehlt. Es liegt nahe, Substanzen aus dieser Umgebung als Verursacher der in vivo beobachteten Schädigung der Thylakoide in Betracht zu ziehen. Dabei könnte es sich um Substanzen handeln, die in der intakten Zelle nicht an die Thylakoidmembran gelangen können (oder analog an die innere Mitochondrienmembran). Nach dem Zusammenbruch der Kompartimentierung durch die Frosteinwirkung, auf deren mögliche Ursachen in 6.3. näher eingegangen wird, können sie freigesetzt werden, während des Auftauens an die Membranen gelangen und diese schädigen. Auf das Vorhandensein von

toxischen Zellinhaltsstoffen in *Viola* und *Triticum* deuten auch die Ergebnisse von Thylakoidisolierungen aus diesen Pflanzen hin. Es gelang nur, Thylakoide zu isolieren, die ca 25% der Elektronentransportraten von Spinatthylakoiden und keinerlei Photophosphorylierungsaktivität zeigten.

Substanzen mit hohem Schadpotential werden in Pflanzenzellen bevorzugt in der Vakuole gelagert. Eine in der neueren Literatur beschriebene Theorie (s. SENSER UND BECK, 1977; ZIEGLER UND KANDLER, 1980) arbeitet daher mit der Annahme, daß der Tonoplast durch das Frieren zuerst betroffen wird und die in der Vakuole enthaltenen Substanzen - insbesondere Phenole und Gerbstoffe - anschließend die anderen Biomembranen der Zelle schädigen und ihre Enzymsysteme denaturieren (vergl. hierzu auch 6.1).

Eine Modifikation zu dieser Theorie findet sich bei YOSHIDA UND SAKAI (1974). Diese nehmen an, daß es nach der Zerstörung der intrazellulären Kompartimentierung zur Freisetzung von Enzymen kommt, die zu einer raschen Degradation der Zellkomponenten und damit zur Frostschädigung führen. In der Literatur finden sich auch Hinweise, daß die Lysosomen besonders frostempfindlich sein sollen (ASHWOOD-SMITH UND WARBY, 1972). Die Vorstellung von der Freisetzung lytischer Enzyme kann aber auf die in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten nicht zutreffen, da der Schaden sofort nach dem Auftauen manifest ist, wie die Infiltration der Blätter nach dem Auftauen und die Veränderungen der sofort nach dem Auftauen gemessenen biophysikalischen Signale zeigen. Ein enzymatischer Abbau wird aber einen größeren Zeitraum benötigen. Die enzymatische Degradation nach dem Auftauen kann aber eine Rolle bei der Zunahme der Schädigung teilgeschädigter Blätter spielen, wenn diese Blätter für mehrere Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden (s. hierzu auch 6.6).

Andere Autoren sind allerdings der Meinung, daß die Semipermeabilität der Zellmembranen nach dem Frieren weitgehend erhalten bleibt (PALTA UND LI, 1980). Dies folgern sie sowohl aus physiologischen Messungen wie von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Allerdings schreitet bei den von ihnen verwendeten Objekten die Schädigung innerhalb der folgenden zehn Tage ab einem gewissen Grad der Schädigung fort und führt schließlich doch zum Verlust der Semipermeabilität. Derartige Effekte wurden bei unseren Objekten nicht beobachtet. Äußerlich ungeschädigte (nicht infiltrierte) Blätter zeigten auch nach längerer Aufbewahrung keine Inaktivierung. Bei den von PALTA UND LI berichteten Effekten mag es sich daher um objektspezifische Vorgänge handeln.

Mit Preßsaft aus *Spinacia*- und *Viola*-Blättern, der zum großen Teil Substanzen aus der Vakuole enthält, konnte in den hier dargestellten Untersuchungen nie ein Schadmuster an Thylakoiden simuliert werden, das dem Muster beim Frieren in vivo annähernd entspricht. Zwar wird in vitro durch Gegenwart von relativ geringen Saftkonzentrationen bei Zimmertemperatur die Photophosphorylierung stark gehemmt, aber die Elektronentransportrate wird auch durch sehr hohe Saftkonzentrationen nicht erniedrigt (Abb. 33 und 34). Die Erhöhung der Elektronentransportrate unter phosphorylierenden Bedingungen und der erniedrigte Δ pH sowie die Verkürzung der Halbwertszeit des 9-Amino-Acridin-Signals sind Hinweise auf eine Entkopplung. In dem Konzentrationsbereich, in dem die Phosphorylierungsrate steil abfällt, sind diese Änderungen aber sehr gering und können die starke Hemmung der Photophosphorylierung nicht erklären. Möglicherweise handelt es sich bei dieser isolierten Hemmung der Photophosphorylierung durch Zellsaft um eine Folge der Denaturierung oder der Ablösung von Membran-

proteinen, die wie z.B. der Kopplungsfaktor an der ATP-Synthese beteiligt sind. Schäden des Elektronentransports werden erst nach sehr langen Einwirkzeiten (6-12 Stunden) des Zellsaftes auf Thylakoide bei 0 C beobachtet, während beim Frieren von Thylakoiden in vivo der Schaden sofort nach dem Auftauen manifest ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß in der Zelle diese Schadstoffe in erheblich höheren Ausgangskonzentrationen vorliegen, als in diesen Experimenten mit Preßsaft erreicht werden konnte (s.a.u). Obwohl das Schadmuster durch Zellsaft bei 20 C und 0 C in den verschiedenen Ansätzen des Pflanzenmaterials etwas variiert, läßt sich doch feststellen, daß keine Übereinstimmung mit dem Schaden beim Frieren der Thylakoide in situ besteht.

Werden Thylakoide in Gegenwart von Preßsaft gefroren, so tritt statt einer Schädigung beim Frieren und Auftauen eine Schutzwirkung auf. Bei Temperaturen, die in vivo zur vollständigen Inaktivierung der Thylakoide führen (-40 C), bleiben in Gegenwart von Preßsaft in vitro gefrorene Thylakoide weitgehend ungeschädigt. Diese Schutzwirkung des Preßsaftes ist um so erstaunlicher, als man bisher glaubte, die Thylakoide bei ihrer Isolierung aus Spinatblättern durch ein schnelles Vorgehen vor den Schadstoffen aus der Vakuole schützen zu müssen. Beim Frieren auf -40 C wird die Konzentration dieser Vakuoleninhaltsstoffe in der ungefrorenen Restlösung aber noch um ein Vielfaches angehoben. Statt der erwarteten Schadwirkung zeigen die Vakuolenstoffe sogar noch einen neutralisierenden Effekt auf andere, dem Ansatz vor dem Frieren zugegebene Schadstoffe wie z.B. NaCl. Dabei ist die Schutzwirkung gegenüber hohen Konzentrationen von Salzionen (200 bis 250 mM NaCl) bei Preßsaft aus ungehärteten Spinatblättern nur geringfügig niedriger als von Saft aus gehärteten Spinatblättern - ein Hinweis dafür, daß es sich bei dieser Schutzwirkung wohl um einen unspezifischen Effekt handelt.

Der Preßsaft enthält u.a. Zucker und Eiweiße. Im Zuckergehalt zeigen sich deutliche Unterschiede je nach Härtungsgrad der Blätter, wie dies auch in anderen Untersuchungen von Zellextrakten beobachtet wurde (SANTARIUS UND MILDE, 1977; KÖPPEN, 1979; TRÖSTER, 1982). Dagegen sind beim Eiweißgehalt der Säfte keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Härtung feststellbar. Aus Untersuchungen von HEBER (1970) ist bekannt, daß spezifische Frostschutzproteine in sehr geringen Konzentrationen schützen können, wenn sie mit anderen Schutzstoffen kombiniert werden. Es ist daher zu vermuten, daß die Schutzwirkung des Preßsaftes auf einer Kombinationswirkung der im Saft enthaltenen Zucker und Proteine beruht. Derartige potenzierende Schutzeffekte wurden schon von HEBER (1970) sowie von HEBER UND KEMPFLE (1970) für Saccharose und Rinderserumalbumin gefunden. Die spezifischen Schutzproteine, die HEBER (1970) und VOLGER UND HEBER (1975) beschrieben haben, können dagegen für den beobachteten Schutzeffekt nur eine geringe Rolle spielen. VOLGER UND HEBER fanden diese Schutzproteine nur in gehärteten Spinatblättern. In den hier dargestellten Experimenten war aber Preßsaft aus ungehärteten Spinatblättern fast ebenso schutzpotent wie Preßsaft aus gehärteten Spinatblättern.

Für diesen auf den ersten Blick verwirrenden Effekt sind drei mögliche Erklärungen zu diskutieren:

1.) Der Zellsaft in der Vakuole enthält Schutzstoffe in so hoher Konzentration, daß kryotoxische Inhaltsstoffe beim Frieren nicht zur Wirkung kommen. In diesem Fall ließe sich die Intaktivierung der Thylakoide in situ nicht durch die Einwirkung des Vakuolensaftes erklären, sondern müßte andere Ursachen haben. Im Zusammenhang mit den schützenden Effekten des Preßsaftes ist die strikte

Limitation der Frosttoleranz in gehärteten Blätter um so erstaunlicher, als gehärtete Blätter auch im Chloroplastenstroma eine hohen Gehalt an kryoprotektiven Substanzen aufweisen.

2.) Der Zellsaft wird durch den Preßvorgang artifiziell verändert, so daß er in vitro anders wirkt, als bei der Aufhebung der Kompartimentierung durch den Gefrier- und Tauvorgang in vivo. Denkbar wäre, daß Schadstoffe bei der Präparation des Saftes an festen Zellinhaltsstoffen adsorbiert oder gebunden werden, oder daß während des Preßvorganges Schutzsubstanzen wie z.B. Proteine freigesetzt werden, die in vivo nicht zur Wirkung kommen können. Diese Überlegungen könnten erklären, weshalb nach dem Frieren von Blatthomogenaten, bei dem die Zellinhaltsstoffe ohne vorhergehende Abtrennung des Saftes auf die Thylakoide einwirken können, ähnliche Schadmuster wie nach der Frostschädigung der Thylakoide in situ gesehen werden. Auf der anderen Seite zeigt aber die schädigende Wirkung des Preßsaftes bei 20 C und z.T. bei 0 C, daß im Zellsaft Schadstoffe vorhanden sein müssen.

3.) Eine Verdünnung des Zellsaftes durch die Medien der Versuchsansätze scheidet als Ursache für das Ausbleiben von schädigenden Effekten nach dem Frieren in Gegenwart von Zellsaft aus, da in Experimenten, in denen Thylakoide in Zellsaft freigesetzt und vor der Isolierung gefroren wurden, ebenfalls keine wesentliche Schädigung der Thylakoide sichtbar ist. Auch in Experimenten, in denen ein höheres Zellsaft/Thylakoid-Verhältnis als in der intakten Zelle angewandt wurde, kam es nicht zur Schädigung.

Für die Inaktivierung der Thylakoide in vivo bieten sich daher folgende Erklärungen an:

1.) Kryotoxische Stoffe befinden sich bereits in der intakten Zelle in der Umgebung der Thylakoide (d.h. im Stroma) oder werden dort während des Gefrier-Tauvorgangs freigesetzt.

In eine ähnliche Richtung weisen auch Berichte von WILLIAMS ET AL. (1981). Während des osmotischen Stresses kann es zu einer irreversiblen Abgabe von Lipiden aus den Zellmembranen kommen. Da von ULLRICH UND HEBER (1961) bekannt ist, daß verschiedene Lipoide hemmend auf die Hill-Reaktion und die Phosphorylierung wirken, ist hier eine Möglichkeit zur Erklärung der Frostschädigung der Thylakoide in situ gegeben. Die Annahme, daß die frostschädigenden Substanzen in vivo in der Umgebung der Thylakoide vorliegen oder während der Frosteinwirkung dort entstehen oder freigesetzt werden, kann auch erklären, weshalb gewaschene Thylakoide in vitro während des Frierens in Gegenwart von Preßsaft nicht mehr typisch geschädigt werden. Die schädigende Komponente könnte während der Isolierung ausgewaschen werden und im Preßsaft nur verdünnt vorliegen. In diesem Zusammenhang sollten auch die Ergebnisse von THEBUD UND SANTARIUS (1981A) berücksichtigt werden: Während sich Thylakoide und Mitochondrien beim Frieren in vivo in ihrer Frostempfindlichkeit nicht unterscheiden, sind Mitochondrien beim Frieren in vitro frostresistenter als Thylakoide. Dies kann ein Hinweis auf einen nicht zu den anorganischen Salzen gehörenden zusätzlichen Schadfaktor sein, der ev. durch den Isolationsvorgang eliminiert wird und deshalb in vitro in den Frostexperimenten nicht zur Wirkung kommt.

2.) Durch Störung der Kompartimentierung dringen nur bestimmte (schädigende) Inhaltsstoffe der Vakuole in die Chloroplasten ein.

3.) Die Schädigung der Thylakoide wird im wesentlichen nicht durch Schadstoffeinwirkung, sondern durch physikalische Effekte bewirkt. Nicht auszuschliessen ist aber eine sekundäre Schädigung oder eine Verstärkung der Primärschädigung der Thylakoide durch Zellinhaltsstoffe (s.a.u.)

In die bisherigen Überlegungen läßt sich das Ergebnis einer Untersuchung nur schwer einordnen: Die Experimente mit gefrorenen Blatthomogenaten, die ohne Verdünnungsmedium durch Mörsern erhalten worden waren (Abb. 44). Durch die Homogenisation wird die Zellkompartimentierung aufgehoben, Es zeigt sich eine Teilentkopplung von Elektronentransport und Photophosphorylierung vor dem Frieren, ähnlich wie nach der Einwirkung von Zellsaft auf Thylakoide bei 20 C. Während Thylakoide aus ungehärteten Spinatblättern durch Frieren des Homogenats ab -8 C bis -10 C voll inaktiviert werden, werden Thylakoide aus gehärteten Spinatblättern auch bei -30 C nur bis ca 50% der Kontrollrate inaktiviert. Diese Inaktivierung beginnt zwar ebenfalls bei -8 C, bleibt aber danach bis -30 C auf gleicher Höhe. Die Inaktivierung durch Frostbehandlung des Homogenats (besonders der ungehärteten Blätter) entspricht zwar der Frostschädigung der Thylakoide in vivo, jedoch äußert sich die primäre Wirkung des Zellsaftes bereits bei 0 C in einer weitgehenden Entkopplung. Dieser Effekt widerspricht der These, daß die Schädigung in vivo durch Vakuolensaft nach dem Auftauen erfolgt. Ferner bleiben die Thylakoide im Homogenat aus gehärteten Blättern bis -30 C teilweise geschützt, während die gehärteten Spinatblätter und ihre Thylakoide in situ bei diesen Temperaturen stets voll geschädigt werden. Dies widerspricht einer Einwirkung des Zellsaftes auf die Thylakoide während des Frierens in vivo.

Die Schutzstoffe, die zweifellos im Preßsaft enthalten sind und auch bei sehr tiefen Temperaturen die Thylakoide noch voll zu schützen vermögen, kommen in vivo offenbar nicht zum Zuge. Dies spricht gegen einen vollständigen Zusammenbruch der Kompartimentierung während des Frierens. Unklar bleibt bei den Versuchen, die Schädigung als Folge der Einwirkung kryotoxischer Substanzen zu erklären, die schadensverstärkende Wirkung des Auftauvorgangs. Hier könnten vielleicht physikalische Effekte eine Rolle spielen, auf die in 6.3 näher eingegangen wird. Eine Reihe von potentiellen Schadstoffen, unter anderem NaCl, $MgCl_2$ und amphiphile Substanzen wie Phenylalanin, Phenylpyruvat, Caprylat, deren membranschädigende Wirkung bekannt ist (HEBER ET AL., 1973; HEBER ET AL., 1979A), wurden in ihrer Wirkung untersucht. Das Muster der Schädigung der Thylakoide in Gegenwart von Salzionen entspricht, wie schon eingehend diskutiert wurde, nicht dem Schadmuster in vivo.

Das Muster der Schädigung nach dem Frieren und Auftauen in Gegenwart amphiphiler Substanzen zeigt dagegen tatsächlich Ähnlichkeiten zum Frostschaden in vivo: Gekoppelter und entkoppelter Elektronentransport sind effektiv gehemmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Frieren in vivo werden aber auch entkoppelnde Effekte beobachtet: Die nichtzyklische Photophosphorylierung fällt stärker ab als der Elektronentransport. Die bei höheren Konzentrationen verkürzte Halbwertszeit des Zusammenbruchs der Löschung der 9-Amino-Acridin-Fluoreszenz weist auf einen schnelleren Protonenausfluß durch die Membran hin.

Es können also mit amphiphilen Substanzen nur Teilaspekte der In-Vivo-Schädigung erreicht werden. Auch kommt es zu einer Hemmung sowohl der Photophosphorylierung wie des Elektronentransports erst bei unphysiologisch hohen Schadstoffkonzentrationen im Ansatz

(s. Untersuchungen mit Phenylalanin). Zusätzlich treten Effekte auf (s. z.B. die Erhöhung des ATP/$2e^-$-Verhältnisses bei mittleren Konzentrationen von Caprylat), die weder beim Frieren in vitro noch in vivo gesehen werden. Bisher ist in der Literatur auch kein anderer Schadstoff beschrieben, der in der Lage wäre, den In-Vivo-Frostschaden der Thylakoide zu imitieren. Wenn man davon ausgeht, daß die in vivo beobachtete Frostschädigung der Thylakoide durch eine Interaktion von Schadstoffen mit den Membranen entsteht, so ist dies wohl nur noch unter der Annahme denkbar, daß der Frostschaden nicht das Ergebnis der Einwirkung eines einzelnen Schadstoffes oder einer Schadstoffgruppe ist, sondern daß es sich um die kombinierte Wirkung zahlreicher Schadstoffe handelt, daß also die komplexe stoffliche Zusammensetzung des Stromas unter dem Frieren und Auftauen zu dem beobachteten Thylakoidschaden führt. Diesen Überlegungen stehen aber die Ergebnisse der wenigen Arbeiten über die Wirkung von Schadstoffkombinationen während des Frierens entgegen, in denen meistens über kolligative Mechanismen eine gegseitige Abschwächung der toxischen Wirkung beobachtet wird (s. SANTARIUS, 1971a).

6.3. Hinweise auf eine Beteiligung physikalischer Effekte an der Frostschädigung von Pflanzen

Auf die Beteiligung physikalischer Vorgänge an der Entstehung der Frostschädigung weist u.a. die Beobachtung hin, daß nahezu alle wesentlichen Parameter der Photosynthese und vermutlich auch der Atmung sowie die Intaktheit der Chloroplastenhülle beim Frieren der Blätter in einem sehr engen Temperaturbereich geschädigt

bzw. inaktiviert werden. Geht man wie in 6.2 von Schadstoffen als Ursache der Frostschädigung aus, würde dies eine multifaktorielle Wirkungsweise dieser Schadstoffe voraussetzen. Ein Hinweis auf das Vorhandensein physikalischer Schadeffekte mag sein, daß es mit unterschiedlichen Schadstofftypen in vitro nicht gelang, das In-Vivo-Schadmuster der Frostschädigung von Thylakoiden nachzuahmen. Weiterhin ist schwer zu verstehen, weshalb Thylakoide in situ nur bis zu einer bestimmten Grenztemperatur geschützt sind, während sie in vitro in Gegenwart von Schutzstoffen oder in Gegenwart von Preßsaft Temperaturen bis -40 C ohne wesentlichen Schaden überstehen. Auch dies kann als Hinweis auf ein physikalisches Phänomen als Ursache der Frostschädigung gewertet werden. Zumindest in den Chloroplasten gehärteter Blätter sind hohe Schutzstoffkonzentrationen anzunehmen.

Sehr strittig ist in der Literatur noch immer die Frage, ob die entscheidende Schädigung während des Frierens oder während des Auftauens gesetzt wird, und welchen Einfluß die Geschwindigkeit der Kältebehandlund auf die Frostschädigung hat (s. hierzu auch unter 5.1.6). In unseren Experimenten, in denen ein Auftauen der Thylakoide in situ verhindert wurde, indem die Thylakoide aus den gefrorenen Blättern isoliert wurden, zeigt sich eine Verschiebung des Temperaturbereichs der Frostschädigung zu tieferen Temperaturen. Das Muster der Frostschädigung blieb aber im wesentlichen unverändert, in einigen Experimenten zeigte sich eine etwas höhere Empfindlichkeit der Phosphorylierung (ohne daß eine Entkopplung vom Elektronentransport nachweisbar war). Diese Experimente waren ursprünglich dahingehend gedeutet worden, daß die Thylakoide in diesen Experimenten vor der schädigenden Einwirkung von Vakuoleninhaltsstoffen bewahrt werden, die während

des Auftauens freigesetzt werden (s.a. 6.2). Hierbei blieb aber ungeklärt, weshalb lediglich eine Verschiebung des Schadmusters zu tieferen Temperaturen erfolgte und kein "Frostschutz" unabhängig von der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms eintrat.

Die Experimente, in denen Thylakoide vor dem Auftauen der Blätter isoliert wurden, legen nahe, daß die Schädigung der Thylakoide zwar während des Frierens "vorprogrammiert", aber erst während des langsamen Tauens manifest wird - eine Auffassung, die auch WIEST UND STEPONKUS (1978) vertreten. Die Schädigung beim Auftauen scheint übrigens nicht nur für Thylakoide zu gelten. SINGH ET AL. (1977) berichten, daß auch Mitochondrien, die aus letal frostgeschädigten Pflanzenzellen sofort nach dem Auftauen isoliert werden, nahezu ihre volle Atmungskapazität behalten. Dagegen sind später isolierte Mitochondrien inaktiviert. Dies schließt aber nicht aus, daß andere Membransysteme bereits vor dem Tauen geschädigt werden. So vermutet MAZUR (1967), daß bei Hefezellen der Schaden durch physikalische Effekte schon vorhanden ist, bevor die Zellen wieder aufgetaut werden. Ebenso berichten STOUT ET AL. (1980 UND 1981) über eine Schädigung von Plasmalemma und Tonoplast von Pflanzenzellen während des Frierens vor dem Auftauen.

Unter Berücksichtigung der in 6.2 dargestellten Beobachtungen und Überlegungen können die Ergebnisse dieser Experimente als Hinweis auf physikalische Schadmechanismen gewertet werden. So hat ULLRICH (1962) schon sehr früh berichtet, daß bei Zellen "Frostschutz" erreicht werden kann, wenn durch schnelles Auftauen eine Rekristallisation des Wassers vermieden wird. AMRHEIN (1975) zeigte, daß es mehrere Formen von Kristallen gibt, die je nach den Konzentrationsverhältnissen im Ansatz und der

Geschwindigkeit der Unterkühlung bevorzugt gebildet werden. Nach MAZUR (1967) führen insbesondere Rekristallisationsvorgänge während des langsamen Auftauens zur Bildung "ungünstiger Kristallformen", die zu einer mechanischen Zerstörung der strukturellen Komponenten der Zelle führen können. Die oben erwähnten Experimente können in Einklang mit diesen Theorien nun so gedeutet werden, daß beim Isolieren der Thylakoide aus gefrorenen Blättern der Auftauvorgang so rasch erfolgt, daß Rekristallisationsprozesse, die das Plasmalemma schädigen und so sekundär auch zu einer Schädigung des Tonoplasten und der Chloroplastenhülle führen könnten, nicht zum Zuge kommen. Mit einem weiteren Absinken der tiefsten Temperatur des Kälteprogramms wird die Zeit, die für den Auftauvorgang benötigt wird, wieder verlängert, so daß wieder eine Schädigung durch Rekristallisation erfolgen kann. Dies könnte erklären, weshalb in diesen Experimenten nur eine Verschiebung der Schadtemperatur erfolgte, es aber nicht zu einem generellen Vermeiden der Frostschädigung kam.

Auf der anderen Seite sollte nicht verschwiegen werden, daß es in der Literatur auch Mitteilungen gibt, die diese Kristalltheorie in Frage stellen. So ist bekannt, daß schnelles Frieren wesentlich unschädlicher sein kann als langsames Frieren (s. MAZUR UND SCHMIDT, 1968; LOVELOCK, 1953B), obwohl dabei die Gefahr der intrazellulären Eisbildung erhöht ist. Diese Beobachtung könnte vielmehr bedeuten, daß der Schaden beim schnellen Frieren deshalb geringer ist, weil die Einwirkzeit konzentrierter Schadstoffe in einem vermuteten kritischen Temperaturbereich (s. LOVELOCK, 1953A UND B) verringert ist.

Eine andere in der Literatur diskutierte Theorie kann u.U. eine Verbindung zwischen der Frostschädigung durch physikalische und durch chemische Effekte herstellen. Nach MERYMAN (1971A UND B) soll ein Schaden dann eintreten, wenn das Zellvolumen während des Frierens auf ca 60% der Kontrolle geschrumpft ist. Der Membranschaden tritt danach ein, wenn während des Frierens ein gewisses kritisches Volumen der Membranvesikel unterschritten wird, wie dies für die Lysis von roten Blutzellen postuliert wird (s. WILLIAMS UND SHAW, 1980), oder wenn die Membranen der Zelle während des Auftauens zu stark gestreckt werden (WIEST UND STEPONKUS, 1978). Danach kommt es zur Schädigung, wenn die geschrumpften Zellen das Wasser wieder aufnehmen, weil während des Schrumpfens innerhalb der Membran Umlagerungen erfolgt sind, die die Flexibilität der Membran beeinträchtigen. Nach LARCHER (1981B) können derartige osmotische Effekte besonders bei Pflanzengeweben schädigend wirken, da dort durch das Schrumpfen der Zellen die Wandspannung und damit die Belastung der Zellmembran besonders stark ansteigt.

Nach WILLIAMS UND MERYMAN (1970) soll auch auf der Ebene der Chloroplasten die Volumenreduktion für die Membranschädigung verantwortlich sein. Durch JENSEN (1981) und SANTARIUS UND GIERSCH (1983) ist bekannt, daß beim Frieren von Thylakoiden in stark hypotonischen Medien (wobei es zu einem sehr starken Schrumpfen der Thylakoide kommt) eine besonders schwere Schädigung der Thylakoide zu erwarten ist. Dagegen spricht aber, daß in unseren Untersuchungen Thylakoide, die im gefrorenen Zustand isoliert wurden, im Vergleich zu in situ aufgetauten Thylakoiden im entsprechenden Temperaturbereich keine Frostschädigung aufwiesen. Auch die früher oft als Schadensursache diskutierte

Dehydratation der Biomembranen (SIMINOVITCH, 1981) scheint demnach nicht die alleinige Schadensursache zu sein. Ebenfalls spricht gegen die Theorie der Frostschädigung der Thylakoide durch das Schrumpfen, daß sie in Gegenwart der richtigen Schutzstoffe sehr niedrige Temperaturen mit extremer Schrumpfung vertragen (s. z.B. Abb. 42). Für die Schädigung der Thylakoide unter üblichen Frier- und Auftaubedingungen ist daher eher eine Einwirkung von freigesetzten Schadstoffen zu erwägen (vergl. 6.2). Die Schädigung der Thylakoide in diesen Experimenten bei den tieferen Temperaturen könnte allerdings durch physikalische Effekte bedingt sein. Hier wäre aber erstaunlich, daß zwei verschiedene Schadmechanismen (ein chemischer und ein physikalischer Vorgang) zu identischen (komplexen) Schadmustern führen.

Unter Berücksichtigung der vorstehenden Überlegungen ist nun denkbar, daß während des Frierens primär eine Schädigung von Membranen wie Tonoplast, Plasmalemma und Chloroplastenhülle durch osmotische oder andere physikalische Effekte erfolgt und bei stärkerer Frosteinwirkung die Schädigung an Membransystemen wie den Thylakoiden durch freigesetzte Schadstoffe fortgesetzt wird.

Eutektische Phänomene scheinen keine Rolle bei der Frostschädigung in vivo zu spielen, obwohl über eine parallele Schädigung von Photophosphorylierung und Elektronentransport in diesem Fall berichtet wird (SANTARIUS, 1973A). So liegt z.B. das Eutektikum von NaCl bei -21,1 C. Diese Temperatur liegt weit unterhalb der üblichen Temperatur des Eintritts der Frostschädigung von ungehärteten und z.T. auch der gehärteten Pflanzen. Außerdem hat eine komplexere Salzlösung - wie sie auch das Protoplasma darstellt - einen breiten eutektischen Bereich (zwischen -5 C bis -35 C) und keinen einzelnen eutektischen Punkt (MAZUR UND SCHMIDT, 1968).

6.4. Einfluß der Frosthärtung der Blätter auf die Frostempfindlichkeit der Thylakoide

Bei den hier dargestellten Untersuchungen - wie auch in früheren In-Vitro-Experimenten (Klosson, 1978) - werden nie wesentliche Unterschiede in der Frostempfindlichkeit der Thylakoide aus ungehärteten und gehärteten Blättern beim Frieren mit Salzionen oder amphiphilen Substanzen beobachtet. Bei den Frostexperimenten mit Preßsaft findet sich ein geringfügig geringeres Frostschutzvermögen in den Suspensionen mit Thylakoiden und Preßsaft aus ungehärteten Spinatblättern. Dies dürfte jedoch auf dem unterschiedlichen Schutzstoffgehalt der Preßsäfte beruhen.

Frühere Untersuchungen von Steponkus et al (1977) an Spinatthylakoiden, bei denen je nach Härtungsgrad eine unterschiedliche Frostempfindlichkeit der Thylakoidmembranen festgestellt wurde, können nicht bestätigt werden. Auch Untersuchungen zu Unterschieden der Lipidzusammensetzung ungehärteter und gehärteter Thylakoidmembranen sind sehr widersprüchlich (s. Einleitung).

Die Frosthärtung bei Spinat scheint daher weniger auf einer Veränderung der Thylakoide, sondern auf einer Veränderung der Thylakoidumgebung zu beruhen (Heber und Santarius, 1964). Möglich wäre eine Mehrsynthese von Schutzstoffen oder eine Verminderung der Schadstoffkonzentration. Viele Arbeiten (Santarius und Milde, 1977; Tröster, 1982; Justenhoven, 1982; Köppen, 1979; Volger, 1974) zeigen, daß das erstere in der Natur verwirklicht zu sein scheint.

6.5 Frostschädigung von ganzen Blättern in Abhängigkeit von ihrem Härtungsgrad

Die In-Vivo-Experimente zeigen bei allen untersuchten Species zwar einen Unterschied im Temperaturbereich der Schädigung zwischen ungehärteten und gehärteten Blättern. Der Ablauf der Schädigung scheint aber prinzipiell immer gleich zu sein. Die Härtung verändert demnach nicht den Mechanismus der Schädigung, sondern verschiebt nur die Grenze der Frosttoleranz zu niedrigeren Temperaturen. Dieser Anstieg der Frosttoleranz ist eng korreliert mit der im Verlauf der Härtung erfolgenden Akkumulation von kryoprotektiven Substanzen wie Zucker, gewissen Aminosäuren und Poteinen (s. Santarius und Milde, 1977; Köppen, 1979; Tröster, 1982; Tab. VIII in dieser Arbeit). Trotz der beim Preßsaft festgestellten hohen Schutzpotenz ist die Frosttoleranz von gehärteten Blättern aller untersuchten Species in vivo begrenzt. Dabei zeigen sich je nach Species sehr deutliche Unterschiede in der Fähigkeit zum Erwerb der Frostresistenz.

Bei den gehärteten Blättern wird oft auch ein größerer Temperaturbereich zwischen beginnender und vollständiger Schädigung beobachtet. Dies spricht für eine unterschiedliche Kapazität der einzelnen Zellen der Blätter zum Erwerb der Frostresistenz. Da ein Blatt Zellen verschiedenen Alters enthält, kann hier wieder der oben erwähnte Einfluß der Alterung auf die Frostschädigung eine Rolle spielen (Towill und Mazur, 1976; s.a. 6.6).

Siminovitch (1981) berichtet von holzigen Pflanzen, daß für den Erwerb der Frosthärte nicht so sehr die Temperatur der Umgebung als vielmehr die innere Uhr der Pflanze und die jahreszeitliche Umstellung der

Tag-/Nachtlänge entscheidend sind. Für krautige Pflanzen scheint dies in dieser Ausschließlichkeit nicht zu gelten. Die Härtung wurde in der Klimakammer hauptsächlich durch Variation der Temperatur erreicht. Bei *Spinacia* ist die Härtung und Enthärtung nicht notwendigerweise von einer Verlängerung oder Verkürzung der Photoperiode abhängig (eigene unveröffentliche Beobachtungen, bestätigt durch unveröffentliche Beobachtungen von KÖPPEN und TRÖSTER). Allerdings wissen wir von (nicht dargestellten) Beobachtungen bei *Viola*, daß man bereits durch Verkürzung der Beleuchtungsdauer (Kurztag) im Gewächshaus bei ca +20 C eine gewisse Frosthärte erreichen kann. Diese Härte liegt aber noch erheblich unter dem Härtungsgrad, der sich bei Kurztag und 1 C erreichen läßt. Auch bei krautigen Pflanzen kann also die Veränderung der Tageslänge eine Rolle für die Frosthärtung spielen.

6.6 Möglichkeiten frostgeschädigter Pflanzen zur Erholung

Frühere Untersuchungen (KLOSSON, DIPLOMARBEIT 1978) zeigten, daß frostgeschädigte Blätter von *Spinacia* nicht zur Erholung befähigt sind. Die Inaktivierung der Photosynthese bei Spinat ist nicht reversibel, und der Zustand der Blätter verschlechterte sich bei Aufbewahrung der teilgeschädigten Blätter bei 20 C innerhalb weniger Tage. Dies konnte in dieser Arbeit sowohl für andere krautige Pflanzen (*Viola*, *Tetragonia*) wie für eine holzige Pflanze (*Hedera*) bestätigt werden. Auch konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Objekten nie eine bedeutend gesteigerte Atmung nach

dem Auftauen nachgewiesen werden. Dies wird aber in der Literatur als wichtiges Anzeichen für die Durchführung von Reparaturvorgängen angesehen (LARCHER, 1983).

Da in der Literatur über die Erholung ganzer Pflanzen nach der Frostschädigung berichtet wird (s. BAUER ET AL., 1969; LARCHER, 1969), wurde dies an Spinatpflanzen eingehender untersucht. Es konnte eine geringe Erholungsfähigkeit von Spinatpflanzen mit teilgeschädigten Blättern beobachtet werden, die von ungeschädigten Blättern - insbesondere von jungen Blattknospen - ausgeht. Auch LARCHER (1981B) beobachtete, daß einzelne Organe und Gewebe einer Pflanze in der Kälteakklimatisation verschieden weit fortgeschritten sein können. Dabei gelten die Sproßachselknospen als besonders resistent. Eine Erholung durch Reparationsvorgänge in geschädigten Zellen, wie sie z.B. von PALTA UND LI (1980) für *Allium cepa L.* nachgewiesen wurde, kann zumindestens für die hier untersuchten Pflanzen ausgeschlossen werden.

Voraussetzung für die Erholungsfähigkeit muß aber sein, daß Sproß und Blattknospen eine größere Frosttoleranz besitzen als die übrigen Spinatblätter. KLOSSON (DIPLOMARBEIT,1978) konnte zeigen, daß junge Blätter an sich keine größere Frosttoleranz besitzen als ältere Blätter. Allerdings ist es möglich, daß sich in situ durch ihre geschützte Stellung in der Mitte der Blattrosette und durch ihre in dieser Arbeit festgestellte höhere Atmungsaktivität die Einwirkmöglichkeiten des Frostes vermindern. Jüngere Blätter könnten auch durch eine geringere Größe ihrer Vakuole unempfindlicher sein (TOWILL UND MAZUR, 1976), da eine geringere Vakuolengröße sowohl weniger (schädigende) Vakuoleninhaltsstoffe als auch ein anderes Verhalten gegenüber osmotischem Streß bedeuten kann.

6.7 Schlußfolgerungen zum Mechanismus der Frostschädigung in vivo

Wie die vorhergehende Diskussion zeigt, ist eine abschließende Interpretation der Vielzahl der hier dargestellten Ergebnisse schwierig. Trotzdem soll versucht werden, zum Schluß der Arbeit ein Modell der Frostschädigung zu entwerfen (Abb. 48).

Bei der Frostschädigung der Zelle scheinen 2 Prozesse zusammenzuspielen. In dem einen Vorgang werden primär Tonoplast, Plasmalemma sowie eventuell die Hüllmembranen der Chloroplasten betroffen. Die Kompartimentierung der Zelle wird gestört. Als erstes Ergebnis dieses Vorgangs zeigt sich eine teilweise Inaktivierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung. Bei diesem Schritt der Frostschädigung ist die Beteiligung physikalischer Schadprozesse wie Rekristallisation oder osmotischer Streß denkbar. Die Frage, ob dieser Schaden bereits beim Frieren gesetzt wird oder erst beim Auftauen eintritt,wurde hier nicht untersucht und muß unbeantwortet bleiben. Ebensowenig lassen die vorliegenden Ergebnisse sicher entscheiden, ob die zuerst sichtbare, von der Inaktivierung der Thylakoide unabhängige, Hemmung der CO_2-Fixierung noch reparierbar ist.

Bei stärkerer Frosteinwirkung wird in einem zweiten Vorgang die Inaktivierung der Thylakoide (und wahrscheinlich des Atmungssystems der Mitochondrien) bewirkt. Alle Ergebnisse weisen darauf hin, daß dieser Vorgang irreversibel ist. Obgleich die Thylakoide etwas weniger frostempfindlich erscheinen als die CO_2-Fixierung, ist nicht zu entscheiden, ob deren Schädigung die Folge des ersten Vorgangs ist. Denkbar ist aber, daß durch die Aufhebung der Kompartimentierung in der Zelle die Freisetzung von toxischen Substanzen (z.B. aus der

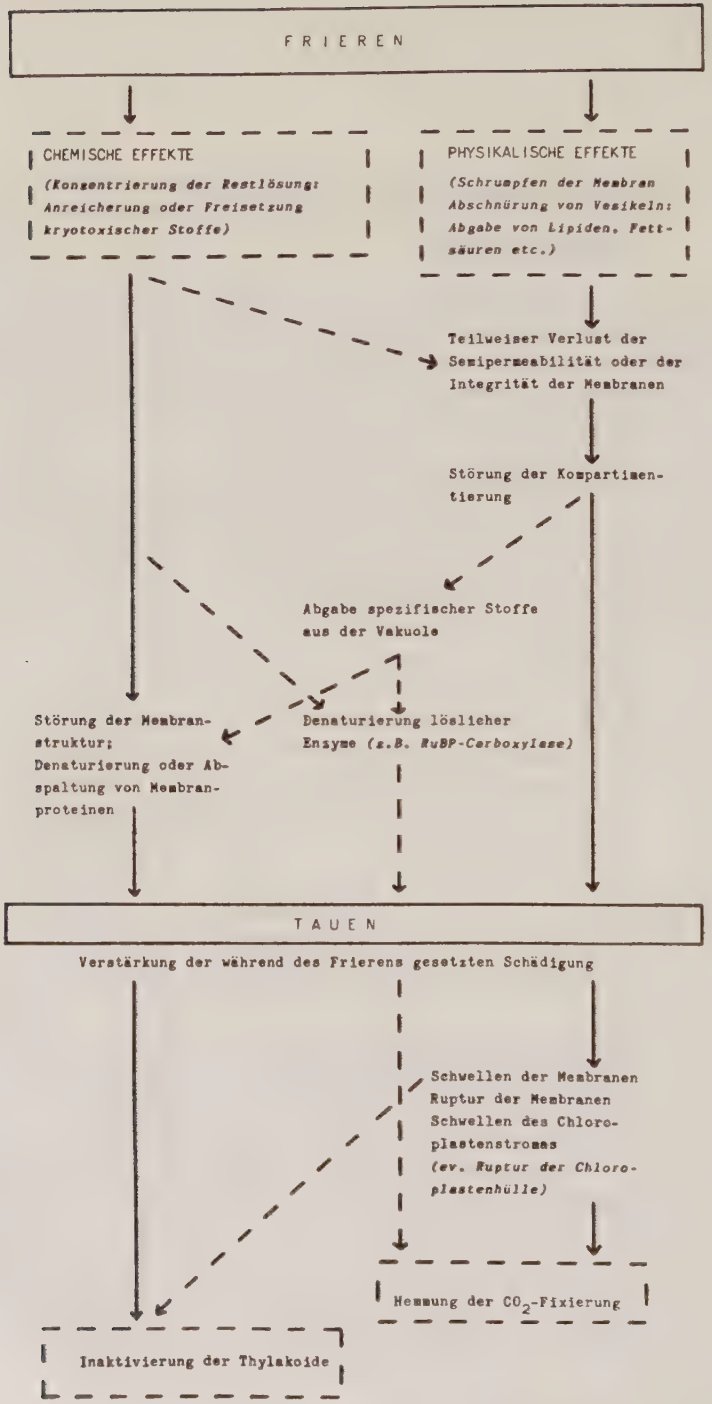

ABB. 48: Vereinfachtes Modell der Frostschädigung bei Spinatblättern

Vakuole) ermöglicht wird. Diese gelangen an Thylakoid- und Mitochondrienmembranen und könnten die während des Frierens bereits eingetretene Schädigung beim Auftauen verstärken. Der Zellsaft als Gesamtheit kann nach den vorliegenden Ergebnissen aber nicht die alleinige Ursache der Frostschädigung sein. Ebenso ist es denkbar, daß kryotoxische Stoffe in den Chloroplasten bereits vorhanden sind (oder dort beim Frieren freigesetzt werden) und ihre Wirkung durch das Auftauen verstärkt oder erst manifest wird.

Jedoch kann über den Ablauf der Schädigung der Thylakoide sowie über die Natur der Schadstoffe bisher nur spekuliert werden. Da verschiedene in vitro untersuchte Schadstoffe immer nur ein Teilspektrum der In-Vivo-Schädigung setzen, ist die Annahme berechtigt, daß es sich bei der Schädigung der Thylakoide um einen multifaktoriellen Vorgang durch eine Kombination verschiedenster Schadstoffe und Schadprozesse handelt.

7. Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen zur Frostschädigung an ungehärteten und gehärteten Blättern von *Spinacia oleracea L.*, *Tetragonia tetragonioides (Pall) O. Kunze*, *Viola x wittrockiana Gams*, *Triticum aestivum L.* und *Hedera helix L.* durchgeführt. Im Vordergrund der Arbeit stand die Untersuchung der Inaktivierung des Photosyntheseapparats durch Frosteinwirkung.

Nach einer kontrollierten Frostbehandlung (langsames Abkühlen, Verweilen bei einer Minimumtemperatur, langsames Erwärmen) wurden die Blätter auf Schädigungen hin untersucht. Dies geschah zum einen durch die Messung des CO_2-Gaswechsels (Photosynthese und Atmung), zum anderen durch die Messung der Chlorophyll-a-Fluoreszenz, der apparenten Absorptionsänderung bei 535 nm und des Membranpotential-abhängigen Signals bei 535 nm, die ein Maß für die photosynthetischen Aktivitäten der Thylakoide *in situ* darstellen. Weiterhin wurde der ATP-Spiegel in kältebehandelten Blättern bestimmt. Aus frostbehandelten Spinatblättern wurden Thylakoidmembranen isoliert, um an Hand deren photosynthetischen Aktivitäten Hinweise zu Art und Ausmaß der Schädigung zu erhalten. Ferner wurde geprüft, inwieweit frostgeschädigte ganze Spinatpflanzen zu einer Erholung fähig sind.

In den Experimenten erwies sich bei den krautigen Pflanzen die photosynthetische CO_2-Fixierung als etwas frostempfindlicher als die Thylakoidreaktionen; es wurden Hinweise auf eine frostinduzierte Störung des Calvin-Zyklus gefunden, die unabhängig von der Inaktivierung der Thylakoide ist. Die Hemmung der CO_2-Fixierung könnte indirekt durch eine primäre Schädigung

von Plasmalemma, Tonoplast, und Chloroplastenhülle bewirkt werden. CO_2-Diffusionsstörungen durch einen möglichen frostbedingten Stomataschluß konnten bei Spinat als Ursache ausgeschlossen werden. Bei den Thylakoidmembranen erfolgten Schädigungen des Elektronentransportsystems an verschiedenen Stellen, wie sich durch Hemmung der Aktivitäten der Photosysteme I und II sowie des Wasserspaltungssystems nachweisen ließ. Eine primäre Entkopplung des Elektronentransports von der Photophosphorylierung trat nicht ein, d.h. die ebenfalls beobachtete Hemmung der Photophosphorylierung ließ sich nicht auf eine erhöhte H^+-Permeabilität der Thylakoidmembran zurückführen, sondern beruht auf der Erniedrigung der Elektronentransportkapazität. Es konnte außerdem festgestellt werden, daß die Schädigung der Thylakoidmembran durch langsames Auftauen erheblich verstärkt wird.

Um nähere Aufschlüsse über den Mechanismus der Frostschädigung zu erhalten, wurden Spinat-Thylakoide *in vitro* ähnlichen Frier-Tau-Vorgängen wie die Blätter unterworfen und die Effekte bekannter kryotoxischer Stoffe überprüft. In einer ausgedehnten Versuchsreihe wurde zusätzlich die Wirkung von Vakuoleninhaltsstoffen (Preßsaft aus Blättern) auf Thylakoide untersucht, deren Einwirkung auf Chloroplasten beim Frieren und Tauen als Ursache der Frostschädigung der Thylakoide *in situ* diskutiert wird.

Es zeigte sich, daß die Frosteinwirkung auf Thylakoide *in vivo* und *in vitro* zu unterschiedlichen Schädigungen führt. *In vitro* kommt es meist zu einer Entkopplung des Elektronentransports von der Photophosphorylierung sowie zu einer erhöhten H^+-Durchlässigkeit der Thylakoidmembran. Auch mit Preßsaft wurde nie ein Schadmuster wie *in vivo* gesehen, unter Frostbedingungen kam es sogar zu schützenden statt zu

schädigenden Einflüssen des Preßsaftes. Es ergaben sich aber Hinweise auf die Existenz von Schadstoffen in der Nähe der geschädigten Membranen, die während des Frierens und Tauens *in situ* aktiv werden sowie Hinweise auf physikalische Schadeffekte.

Die Akklimation an niedrige Temperaturen bedingt eine erheblich erhöhte, jedoch scharf begrenzte Frosttoleranz der Blätter, ohne daß die Temperatur der spontan einsetzenden Eisbildung im Gewebe erniedrigt wird. Beginnende Eisbildung steht demnach nicht im direkten Zusammenhang mit der Schädigung. Die Härtung verändert nicht den prinzipiellen Verlauf und das Muster der Frostschädigung. Ferner verändert sich durch die Härtung nicht die Empfindlichkeit der Thylakoide gegen Frost *in vitro*, so daß bei gehärteten Blättern die erhöhte Frosttoleranz der Thylakoide *in situ* auf einer Anreicherung von Frostschutzsubstanzen beruhen dürfte.

Auch bei Frostbehandlung ganzer Pflanzen erwies sich die Hemmung der Photosynthese in den geschädigten Blättern als irreversibel. Nur aus ungeschädigten Pflanzenteilen, z.B. aus überlebenden jungen Blättern, war eine Regeneration der Pflanze möglich.

LITERATURVERZEICHNIS

Amrhein, E.-M. (1975); Comparative Crystallization Behaviour of Polymers and Aqueous Solutions. In: Cryobiology 12, S. 340-352

Arnon, D.I. (1949), Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. In: Plant Physiol. 24, S. 1-15

Ashwood-Smith, M.J., Warby, C. (1972); Protective Effect of Low and High Molecular Weight Compounds on the Stability of Catalase subjected to Freezing and Thawing. In: Cryobiology 9, S. 137-140

Baltscheffsky, M., Hall, D.O. (1974); Photophosphorylation and the 518 nm Absorbance Change in tightly Coupled Chloroplasts. In: FEBS Letters 39, S. 345-348

Bauer, H., Huter, M., Larcher, W. (1969); Der Einfluß und die Nachwirkung von Hitze und Kältestreß auf den CO_2-Gaswechsel von Tanne und Ahorn. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, S. 65-70

De Benedetti, E., Garlaschi, F.M. (1977); On the Estimation of Proton Gradient and Osmotic Volume in Chloroplast Membranes. In: J. Bioenerg. Biomembr. 9, S. 195-201

Ben-Hayyim, G., Krause, G.H. (1980); Transport of Mono- and Divalent Cations across Chloroplast Membranes mediated by Ionophore A 23187. In: Arch. Biochem. Biophys. 202, S. 546-557

Bergmeyer, H.U. (1970); Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Bd. II, S. 2024, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

Briantais, J.M., Vernotte, C., Picaud, M., Krause, G.H. (1979); A Quantitative Study of the Slow Decline of Chlorophyll a Fluorescence in Isolated Chloroplasts. In: Biochim. Biophys. Acta 548, S. 128-138

Butler, W.L., Kitajima, M. (1975); Energy Transfer between Photosystem II and Photosystem I in Chloroplasts. In: Biochim. Biophys. Acta 396, S. 72-85

Critchley, C. (1976); Untersuchungen an Chloroplastenmembranen über mögliche Veränderungen in den Lipiden im Zusammenhang mit Problemen der Gefrierinaktivierung bzw. der Frostresistenz von Pflanzen. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf

Duane, W.C., Krogman, D.W. (1963); Chloroplast Storage with Retention of Photosynthetic Activities. In: Biochim. Biophys. Acta 71, S. 195-196

Duysens, L.N.M., Sweers, H.E. (1963); Mechanism of two Photochemical Reactions in Algae as Studies by Means of Fluorescence. In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (Jap. Soc. of Plant Physiol., ed., S. 353-372, The University of Tokyo, Tokyo Press, Tokyo/Japan)

Fiolet, J.W., Bakker, E.P., van Dam, K. (1974); The Fluorescence Properties of Acridines in the Present of Chloroplasts or Liposomes. On the Quantitative Relationship between the Fluorescence Quenching and the Transmembrane Proton Gradient. In: Biochim. Biophys. Acta 368, S. 432-445

Garber, M.P., Steponkus, P.L. (1976a); Alterations in Chloroplast Thylakoids during an in vitro Freeze-Thaw Cycle. In: Plant Physiol. 57, S. 673-680

Garber, M.P., Steponkus, P.L. (1976b); Alterations in Chloroplast Thylakoids during Cold Acclimation. In: Plant Physiol. 57, S. 681-686

Giersch, Ch. (1982), Photophosphorylation by Chloroplasts: Effects of Low Concentrations of Ammonia and Methylamine. In: Z. Naturforsch. 37c, S. 242-250

Gusta, L.V., Rajashekar, C., Chen, P.M., Burke, M.J. (1982); Freeze induced Membrane Permeability Changes in Winter Rye. In: Cryo-Letters 3, S. 27-34

Heber, U. (1957); Zur Frage der Lokalisation von löslichen Zuckern in der Pflanzenzelle. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 70, S. 341-382

Heber, U. (1958); Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. In: Planta 52, S. 431-446

Heber, U. (1959a); Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. III. Bedeutung von Proteinen für die Frostresistenz. In: Planta 54, S. 34-67

Heber, U. (1959b); Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem. In: Protoplasma 51, S. 284-298

Heber, U. (1967); Freezing Injury and Uncoupling of Photophosphorylation from Electron Transport in Chloroplasts. In: Plant Physiol. 42, S. 1343-1350

Heber, U. (1968); Freezing Injury in Relation to Loss of Enzyme Activities and Protection against Freezing. In: Cryobiology 5, S. 188-201

Heber, U. (1969); Conformational Changes of Chloroplasts induced by Illumination of Leaves in vivo. In: Biochim. Acta 180, S. 302-319

Heber, U. (1970); Proteins Capable of Protecting Chloroplast Membranes against Freezing. In: Wolstenholme, G.E.W., and O'Connor, Eds., Ciba Foundation Symposium of the Frozen Cell, J. and A. Churchill, London, S. 175-188

Heber, U., Enser, U., Weis, E., Ziem, U., Giersch, Ch. (1979b); Regulation of the Photosynthetic Carbon Cycle, Phosphorylation and Electron Transport in Illuminated Intact Chloroplasts. In: "Modulation of Protein Function", Atkinson, D.E., Ed., Academic Press, New York, S. 113-137

Heber, U., Ernst, R. (1967); A Biochemical Approach to the Problem of Frost Injury and Frost Hardiness. In: "Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms", Proc. Intern. Conf. Low Temp. Sci., Vol. II, E. Asahina, Ed., Bunyeido Printing Co., Sapporo/Japan, S. 63-77

Heber, U., Kempfle, M. (1970); Proteine als Schutzstoffe gegenüber dem Gefriertod der Zelle. In: Z. Naturforsch. 25b, S. 834-842

Heber, U., Santarius, K.A. (1964); Loss of Adenosine Triphosphate Synthesis caused by Freezing and Its Relationship to Frost Hardiness Problems. In: Plant Physiol. 39, S. 712-719

Heber, U., Santarius, K.A. (1970); Direct and Indirect Transfer of ATP and ADP across the Chloroplast Envelope. In: Z. Naturforsch. 25b, S. 140-152

Heber, U., Santarius, K.A. (1973); Cell Death by Cold and Heat and Resistance to Extreme Temperatures. Mechanisms of Hardening and Dehardening. In: "Temperature and Life", Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H., Larcher, W., Eds., Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, S. 232-263

Heber, U., Tyankova, L., Santarius, K.A. (1971); Stabilization and Inactivation of Biological Membranes during Freezing in the Presence of Amino Acids. In: Biochim. Biophys. Acta 241, S. 578-592

Heber, U., Tyankova, L., Santarius, K.A. (1973); Effects of Freezing on Biological Membranes in vivo and in vitro. In: Biochim. Biophys. Acta 291, S. 23-37

Heber, U., Volger, H., Overbeck, V., Santarius, K.A. (1979a); Membrane Damage and Protection during Freezing. In: "Proteins at Low Temperatures", Fennema, O., Ed., Advances in Chemistry Series, No. 180, Am. Chem. Soc., Washington D.C., S. 159-189

Hilditch, T.P., Williams, P.N. (1964); "Chemical Constitution of Natural Fats". 4th Ed., S. 207ff, Chapman and Hall, London, 1964

Hiller, A., Plazin, J., van Slyke, D. (1948); A Study of Conditions for Kjeldahl Determination of Nitrogen in Proteins. Description of Methods with Mercury as Catalyst, and Titrimetric and Gasometric Measurements of Ammonia formed. In: J. Biol. Chem. 176, S. 1401 -1420

Hofmeister, E. (1888); Zur Lehre von der Wirkung der Salze. In: Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 24, S. 247 -260

Huner, N.P.A., Carter, J.V. (1982); Short Communication. Differential Subunits Aggregation of a Purified Protein from Cold-Hardened and Unhardened Puma Rye. In: Z. Pflanzenphysiol. 106, S. 179-184

Huner, N.P.A., Carter, J.V., Wold, F. (1982); Effects of Reducing Agents on the Conformation of Isolated Subunits of Ribulose Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase from Cold-Hardened and Unhardened Rye. In: Z. Pflanzenphysiol. 106, S. 179-184

Izawa, S., Good, N.E. (1972); Inhibition of Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. In: "Methods of Enzymology", San Pietro, A., Ed., Vol. 24, Part B, Academic Press/New York, S. 355-377

Jagendorf, A.T., Avron, M. (1958); Cofactors and Rates of Photosynthetic Phosphorylation by Spinach Chloroplasts. In: J. Biol. Chem. 231, S. 277-290

Jensen, M. (1977); Lichtstreuung an Blättern als Indikator lichtabhängiger Energiekonservierung in vivo, Staatsexamensarbeit, Universität Düsseldorf

Jensen, M. (1981); Die Rolle der Lipidphase bei der Gefrierschädigung von Chloroplastenmembranen. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf

Jensen, M., Heber, U., Oettmeier, W. (1981); Chloroplast Membrane Damage during Freezing: The Lipid Phase. In: Cryobiology 18, S. 322-335

Jeremias, K. (1962); Der Einfluß der Temperatur auf die Speicherung von Saccharose. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 75, S. 313-322

Jeremias, K. (1969); Zur winterlichen Zuckeranhäufung in vegetativen Pflanzenteilen. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82, S. 87-97

Junge, W. (1977); Membrane Potentials in Photosynthesis. In: Annu. Rev. Plant Physiol. 28, S. 503-536

Justenhoven, A. (1982); Zusammenhänge zwischen Frosthärte und Gehalt an freien Aminosäuren in Spinatblättern und Chloroplasten. Staatsexamensarbeit, Universität Düsseldorf

Kaiser, W.M., Heber, U., (1981); Photosynthesis under Osmotic Stress. Effects of High Solute Concentrations on Permeability Properties of the Chloroplast Envelope and Activity of Stroma Enzymes. In: Planta 153, S. 423-429

Kaiser, W.M., Kaiser G., Prachuab, P.K., Wildman, S.G., Heber, U. (1981); Photosynthesis under Osmotic Stress. Inhibition of Photosynthesis of Intact Chloroplasts, Protoplasts and Leaf Slices at High Osmotic Potentials. In: Planta 153, S. 416-422

Kalkar, H.M. (1947); Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by Means of Specific Enzymes. III: Studies of the Enzymes of Purine Metabolism. In: J. Biol. Chem. 167, S. 461-476

Kappen, L. (1969); Frostresistenz einheimischer Halophyten in Beziehung zu ihrem Salz-, Zucker- und Wassergehalt im Sommer und Winter. In: Flora B 158, S. 232-260

Kappen, L., Ullrich, W.R. (1970); Verteilung von Chlorid und Zuckern in Blattzellen halophiler Pflanzen bei verschieden hoher Frostresistenz. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, S. 265-275

Klosson, R.J. (1978); Biophysikalische und biochemische Untersuchungen von Frostschäden bei Pflanzenblättern. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Klosson, R.J.; Krause, G.H. (1981a); Freezing Injury in Cold-Acclimated and Unhardened Spinach Leaves. I. Photosynthetic Reactions of Thylakoids isolated from Frost-Damaged Leaves. In: Planta 151, S. 339-346

Klosson, R.J.; Krause, G.H. (1981b); Freezing Injury in Cold-Acclimated and Unhardened Spinach Leaves. II. Effects of Freezing on Chlorophyll Fluorescence and Light Scattering Reactions. In: Planta 151, S. 347-352

Koeppen, D. (1979); Zuckerakkumulation und -Kompartimentierung in Spinatblättern in Beziehung zur Frostresistenz. Staatsexamensarbeit, Universität Düsseldorf

Koester, S., Heber, U. (1982); Light Scattering and Quenching of 9-Amino-Acridine-Fluorescence as Indicators of the Phosphorylation State of the Adenylate System in Intact Spinach Chloroplasts. In: Biochim. Biophys. Acta 680, S. 88-94

Krause, G.H. (1973); The High-Energy State of the Thylakoid System as indicated by Chlorophyll Fluorescence and Chloroplast Shrinkage. In: Biochim. Biophys. Acta 292, S. 715-728

Krause, G.H. (1974); Changes in Chlorophyll Fluorescence in Relation to Light-Dependent Cation Transfer across Thylakoid Membranes. In: Biochim. Biophys. Acta 333, S. 301-313

Krause, G.H., Briantais, J.M., Vernotte, C. (1981a); Two Mechanisms of Reversible Fluorescence Quenching in Chloroplasts. In: "Photosynthesis. I. Photophysical Processes - Membrane Energization", Oakoyumoglou, G., Ed., Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa., S. 575-584

Krause, G.H., Klosson, R.J., Troester, U. (1981b); On the Mechanism of Freezing Injury and Cold-Acclimation of Spinach Leaves. In: "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Vol. 2, P.H. Li and A. Sakai, Eds., Academic Press/New York, 1982, S. 55-75

Krause, G.H., Lorimer, G.H., Heber, U., Kirk, M.R. (1978); Photorespiratory Energy Dissipation in Leaves and Chloroplasts. In: "Photosynthesis '77", Proc. of the 4th International Congress on Photosynthesis, Hall, D.O., Coombs, J., Goodwin, T.W., Eds., The Biochemical Society/London, S. 299-310

Krause, G.H., Vernotte, C., Briantais, J.M. (1982); Photoinduced Quenching of Chlorophyll Fluorescence in Intact Chloroplasts and Algae. Resolution into two Components. In: Biochim. Biophys. Acta 679, S. 116-124

Laing, W.A., Stitt, M., Heldt, H.W. (1981); Changes in the Activity of Ribulose-Phosphate Kinase and Fructose- and Sedoheptulose-Bisphosphatase in Chloroplasts. In: Biochim. Biophys. Acta 637, S. 348-359

Larcher, W. (1969); Die Temperaturresistenz als Konstitutionsmerkmal der Pflanzen. In: "Klimaresistenz, Photosynthese und Stoffproduktion". Tagungsberichte des 1. Internationalen Baumphysiologischen Symposium (Dtsch. Akad. der Landwirtschaftswiss., Berlin, Ed.), Berlin/DDR

Larcher, W. (1981a); Effects of Low Temperature Stress and Frost-Injury on Plant Productivity. In: Physiological Processes limiting Plant Productivity, Johnson, C.B., ed. S. 253-268, Butterworths, London

Larcher, W. (1981b); Resistenzphysiologische Grundlagen der evolutiven Kälteakklimatisation von Sprosspflanzen. In: Pl. Syst. Evol. 137, S. 145-180

Larcher, W. (1983); Leistungseinschränkung durch Kälte und Frost. In: "Handbuch der Pflanzenkrankheiten", unveröffentlichtes Manuskript

Larcher, W., Bauer, H. (1981); Ecological Significance of Resistance to Low Temperature. In: "Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 12a, Pirson, A., Zimmermann, M.H., Eds., Springer Verlag/Berlin, S. 403-437

Levitt, J. (1956); The Hardiness of Plants, Academic Press/New York

Levitt, J. (1966); Winter Hardiness of plants. In: "Cryobiology", Meryman, H.T., ed., Academic Press/ New York, S. 495-563

Lorimer, G.H. (1981); The Carboxylation and Oxygenation of Ribulose-1,5-Bisphosphatase: The Primary Events in Photosynthesis and Photorespiration. In: Ann. Rev. Plant Physiol. 32, S. 349-383

Lovelock, J.E. (1953a); The Hemolysis of Human Red Blood Cells by Freezing and Thawing. In: Biochim. Biophys. Acta 10, S. 414-426

Lovelock, J.E. (1953b); The Mechanism of the Protective Action of Glycerol against Hemolysis by Freezing and Thawing. In: Biochim. Biophys. Acta 11, S. 28-36

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951); Protein Measurements with Folin Reagent. In: J. Biol. Chem. 193, S.265-275

Lyons, J.M., Raison, J. K., Steponkus, P.L. (1979); The Plant Membrane in Response to Low Temperature - An Overview. In: "Low Temperature Stress in Crop Plants", Lyons, J.M., Graham, D., Raison, J.K., Eds., Academic Press/New York, S. 1-24

Malek, L., Bewley, J.D. (1978); Effects of Various Rates of Freezing on the Metabolism of a Drought-Tolerant Plant, the Moos *Tortula ruralis*. In: Plant Physiol. 61, S. 334-338

Mazur, P. (1967); Physical-chemical Basis of Injury from Intercellular Freezing in Yeast. In: "Cellular Injury and Resistance in Freezing Organism", Proc. of International Conference on Low Temperature Science 1966, E. Asahina, Ed., Hokkaido University, Sapporo/ Japan, Vol. II, S. 171-189

Mazur, P. (1969); Freezing Injury in Plants. In: Ann. Rev. Plant Physiol. 20, S. 419-448

Mazur, P., Schmidt, J.J. (1968); Interactions of Cooling Velocity, Temperature and Warming Velocity on the Survival of Frozen and Thawed Yeast. In: Cryobiology 5, S. 1-17

Meryman, H.T. (1968); Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes. In: Nature 218, S. 333-336

Meryman, H.T. (1971a); Cryoprotective Agents. In: Cryobiology 8, S. 173-183

Mitchell, P. (1966); Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. In: Biol. Rev. 41, S. 445-502

Mohanty, P., Zilinskas-Braun, B., Govindjee, B. (1973); Light-Induced Slow Changes in Chlorophyll a Fluorescence in Isolated Chloroplasts: Effects of Magnesium and Phenazine Methosulfate. In: Biochim. Biophys. Acta 292, S. 459-476

Morris, G.J., Mc Grath, J.J. (1981); The Response of Multilamellar Liposomes to Freezing and Thawing. In: Cryobiology 18, 390-398

Palta, J.P., Li, P.H. (1980); Alteration in Membrane Transport Properties by Freezing Injury in Herbaceous Plants: Evidence against Rupture Theorie. In: Physiol. Plant 30, S.169-175

Redshaw, E.S., Zalik, S. (1968); Changes in Lipids of Cereal Seedlings during Vernalization. In: Canad. J. Biochem. 46, S. 1093-1097

Robinson, S.P., Wiskitch, J.T. (1976); Factors affecting the ADP/O Ratio in Isolated Chloroplasts. In Biochim. Biophys. Acta, S. 131-146

de la Roche, I.A., Andrews, C.J., Kates, M. (1973a); Changes in Phospholipid Composition of a Winter Wheat Cultivar during Germination at 2C and 24C. In: Plant Physiol.51, S.468-473

de la Roche. I.A., Andrews, C.J., Pomeroy, M.K., Weinberger, P., and Kates, M. (1973b); Lipid Changes in Winter Wheat Seedlings (*Triticum aestivum*) at Temperatures inducing Cold Hardiness. In: Canad. J. Bot. 50, S. 2401-2409

Santarius, K.A. (1968); Protective Mechanism in Frost-Hardy Plants. In: "Low Temperature Biology of Foodstuffs", Hawthorn, J., Rolfe, E.R., Eds., Pergamon Press New York, S. 135-151

Santarius, K.A. (1969); Der Einfluß von Elektrolyten auf Chloroplasten beim Gefrieren und Trocknen. In: Planta 89, S. 23-46

Santarius, K.A. (1971a); The Effect of Freezing on Thylakoid Membranes in the Presence of Organic Acids. In: Plant Physiol. 48, S. 156-162

Santarius, K.A. (1971b); Ursachen der Frostschäden und Frostresistenz bei Pflanzen. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, S. 425-436

Santarius, K.A. (1973a); The Effect of Eutectic Crystallization on Biological Membranes. In: Biochim. Biophys. Acta 291, S. 131-146

Santarius, K.A. (1973b); The Protective Effect of Sugars on Chloroplast Membranes during Temperature and Water Stress and Its Relationship to Frost, Desiccation and Heat Resistance. In: Planta 113, S. 105-114

Santarius, K.A. (1978); Biochemical Basis of Frost Resistance in Higher Plants. In: Acta Horticulturae 81, S. 9-21

Santarius, K.A., Ernst, R.(1967); Das Verhalten von Hill-Reaktion und Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten in Abhängigkeit vom Wassergehalt. I. Wasserentzug mittels konzentrierter Lösungen. In: Planta 73, S. 91-108

Santarius, K.A., Giersch, Ch. (1983); Inactivation and Protection of Isolated Thylakoid Membranes during Freezing. In: "Effects of Stress on Photosynthesis"; R. Marcelle, H. Clijsters, M. van Poucke, Eds., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Hague/Boston/London, S. 201-210

Santarius, K.A., Heber, U. (1967); Das Verhalten von Hill-Reaktion und Photophosphorylierung isolierter Chloroplasten in Abhängigkeit vom Wassergehalt. In: Planta 73, S. 109-137

Santarius, K.A., Heber, U. (1970); The Kinetics of the Inactivation of Thylakoid Membranes by Freezing and High Concentrations of Electrolytes. In: Cryobiology 7, S. 71-78

Santarius, K.A., Heber, U., Krause, G.H. (1979); Untersuchungen über die physiologisch-biochemischen Ursachen von Empfindlichkeit und Resistenz von

Biomembranen gegenüber extremen Temperaturen und höheren Salzkonzentrationen. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 92, S. 209-223

Santarius, K.A., Milde, H. (1977); Sugar Compartmentation in Frost-Hardy and partially Dehardened Cabbage Leaf Cells. In: Planta 13, S. 163-166

Scarth, G.W., Levitt, J. (1937); The Frost Hardening Mechanism of Plant Cells. In: Plant Physiol. 12, S. 51-78

Schuldiner, S. Rottenberg, H. Avron, M. (1972); Determination of ΔpH in Chloroplasts. 2. Fluorescent Amines as a Probe for the Determination of ΔpH in Chloroplasts. In: Eur. J. Biochem. 25, S.64-70

Senser, M., Beck, E. (1977); On the Mechanism of Frost Injury and Frost Hardening of Spruce Chloroplasts. In: Planta 137, S. 195-201

Senser, M. Beck, E. (1979); Kälteresistenz der Fichte. II: Einfluß von Photoperiode und Temperatur auf die Struktur und photochemischen Reaktionem von Chloroplasten. In: Ber. Dtsch. Bot. Ges. 92, S. 243-259

Seybold, S. (1969); Zum jahres- und tagesperiodischen Verhalten von Zuckeralkoholen in vegetativen Pflanzenteilen. In: Flora A 160, S. 561-575

Siminovitch, D. (1981); Common and Disparate Elements in the Process of Adaptation of Herbaceous and Woody Plants to Freezing - A Perspective. In: Cryobiology 18, S. 166-185

Siminovitch, D., Rheaume, B., Pomeroy, K., Lepage, M. (1968); Phospholipid, Protein, and Nucleid Acid increase in Protoplasm and Membrane Structure associated with Development of Extreme Freezing Resistance in Black Locust Tree Cells. In: Cryobiology 5, S. 202-225

Siminovitch, D., Singh, J., de la Roche, I.A. (1975); Studies on Membranes in Plant Cells Resistant to Extreme Freezing. I. Augmentation of Phospholipids and Membrane Substance without Changes in Unsaturation of Fatty Acids during Hardening of Black Locust Bark. In: Cryobiology 12, S. 144-153

Singh, J., de la Roche, I.A., Siminovitch, D. (1977); Relative Insensitivity of Mitochondria in Hardened and Nonhardened Rye Coleoptile Cells to Freezing in situ. In: Plant Physiol. 60, S. 713-715

Sprague, M.A. (1955); The Influence of Rate of Cooling and Winter Survival of Ladino Clover and Alfalfa. In: Plant Physiol. 30, S. 447-451

Steponkus, P.L., Garber, M.P., Myers, S.P., Lineberger, R.D. (1977); Effects of Cold Acclimation and Freezing on Structure and Function of Chloroplast Thylakoids. In: Cryobiology 14, S. 303-321

Stout, D.G., Brooke, B., Majak, W., Reaney, M. (1981); Influence of Cold Acclimation on Membrane Injury in Frozen Plant Tissue. In: Plant Physiol. 68, S. 248-251

Stout, D.G., Majak, W., Reaney, M. (1980); In vivo Detection of Membrane Injury at Freezing Temperatures. In: Plant Physiol. 66, S. 74-77

Thebud, R., Santarius, K.A. (1981a); Effects of Freezing on Spinach Leaf Mitochondria and Thylakoids in situ and in vitro. In: Plant Physiol. 68, S. 1156 -1160

Thebud, R., Santarius, K.A. (1981b); Effects of Freezing on Isolated Plant Mitochondria. In: Planta 152, S. 242-247

Thebud, R., Santarius, K.A. (1982); Effects of High Temperature Stress on Various Biomembranes of Leaf Cells in situ and in vitro. In: Plant Physiol. 70, S. 200-205

Tillberg, J.E., Giersch, Ch., Heber, U. (1977); CO_2-Reduction by Intact Chloroplasts under a Diminished Proton Gradient. In: Biochim. Biophys. Acta 511, S. 455-469

Towill, L.E., Mazur, P. (1976); Osmotic Shrinkage as a Factor in Freezing Injury in Plant Tissue Cultures. In: Plant Physiol. 57, S. 290-296

Tröster, U. (1982); Beziehungen zwischen Frosthärte und Zuckergehalt in Blättern und Chloroplasten von Spinat. Staatsexamensarbeit für das Lehramt der Sekundarstufe I, Universität Düsseldorf

Tyankova, L. (1970); Stabilität von Thylakoidmembranen in Gegenwart von Aminosäuren beim Gefrieren. In: Ber. Dtsch. Bot Ges. 83, S. 491-497

Ullrich, H. (1962); Zur Physiologie von Frostresistenz und Frosthärtung. In: Angew. Bot. 36, S. 258-272

Ullrich, H., Heber, U. (1961); Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. IV. Das Verhalten von Fermenten und Fermentsystemen gegenüber tiefen Temperaturen. In: Planta 57, S. 370-390

Vernotte, C., Krause, G.H., Briantais, J.M. (1981); Photoinduced Decline of Chlorophyll Fluorescence in Chlorella. In: "Photosynthesis. I. Photophysical Processes - Membran Energization", G. Akoyunoglou, Ed., Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa.

Volger, H.G. (1974); Proteine als Resistenzfaktoren beim Gefrieren biologischer Membranen. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf

Volger, H.G., Heber, U. (1975); Cryoprotective Leaf Proteins. In: Biochim. Biophys. Acta 412, S. 335-349

Volger, H.G., Heber, U., Berzborn, R.J. (1978); Loss of Function of Biomembranes and Solubilization of Membrane Proteins during Freezing. In: Biochim. Biophys. Acta 511, S. 455-469

Weidner, M., Heuel, R. (1979); Indirect Evidence for Conformational Changes in Proteins from Wheat Seedlings (*Triticum aestivum L.*) preadapted to Chilling and High Temperature. In: Z. Pflanzenphysiol. 94, S. 387-398

Weis, E. (1981); Reversible Heat-Inactivation of the Calvin Cycle: A Possible Mechanism of the Temperature Regulation of Photosynthesis. In: Planta 151, S. 33-39

Wiest, S.C., Steponkus, P.L. (1978); Freeze-Thaw Injury to Isolated Spinach Protoplasts and Its Simulation at above Freezing Temperatures.

Williams, R.J., Meryman, H.T. (1970); Freezing Injury and Resistance in Spinach Chloroplast Grana. In: Plant Physiol. 45, S. 752-755

Williams, R.J., Shaw, S.K. (1980); The Relation between Cell Injury and Osmotic Volume Reduction. II. Red Cell Lysis correlates with Cell Volume rather than Intracellular Salt Concentrations. In: Cryobiology 17, S. 530-539

Williams, R.J., Willemot, C., Hope, H.J. (1981); The Relationship between Cell Injury and Osmotic Volume Reduction. IV. The Behaviour of Hardy Wheat Membrane Lipid in Monolayer. In: Cryobiology 18, S. 146-154

Yoshida, S. Sakai, A. (1974); Phospholipid Degradation in Frozen Plant Cells associated with Freezing Injury. In: Plant Physiol. 53, S. 509-511

Ziegler,P., Kandler, O. (1980); Tonoplast Stability as a Critical Factor in Frost Injury and Hardening of Spruce Needles. In: Z. Pflanzenphysiol. 99, S. 393-410

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, daß ich die Dissertationsarbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe die Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, daß die Dissertation in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bisher von mir an keiner anderen Fakultät eingereicht wurde.

Ich weiß, daß die Fakultät die Promotionsleistungen auch nach Aushändigung der Promotionsurkunde wegen einer falschen Erklärung für ungültig erklären kann.

Herrn Prof. Dr. G. H. Krause (Bot. Inst. II, Universität Düsseldorf) danke ich für die Überlassung des Themas und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. A. Santarius (Bot. Inst. III, Universität Düsseldorf) danke ich für die Übernahme des Co-Referats und für zahlreiche Anregungen.

Ferner bin ich Herrn Prof. Dr. U. Heber (Inst. für Botanik und pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg), Herrn Priv.-Doz. Dr. Ch. Giersch (Bot. Inst. II, Universität Düsseldorf), Herrn Dr. M. Jensen (Bot. Inst., Universität Bochum) und Frau Dipl.-Biol. R. Thebud-Lassak für wertvolle Hinweise dankbar.

Lebenslauf

Name:	Rupert Johannes Klosson
Geburtstag:	23. Mai 1954 in Düsseldorf
Eltern:	Helmut Klosson, Oberamtsrat i.R., Johanna Klosson, geb. Jänsch, Hauswirtschaftsleiterin
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulausbildung:	1. April 1960 bis 23. März 1964: Volksschule an der Färberstraße in Düsseldorf; 1. April 1964 bis 15. Mai 1972: Geschwister-Scholl-Gymnasium in Düsseldorf;
Schulabschluß:	Abitur am 15. Mai 1972;
Studium:	Studium der Biologie von Oktober 1972 bis Juni 1978 an der Universität Düsseldorf; Studium der Humanmedizin von April 1978 bis Oktober 1983 in Düsseldorf;
Abschl. d. Biologiestudium:	Diplom am 30. Juni 1978; Thema der schriftlichen Diplomarbeit: "Biophysikalische und Biochemische Untersuchungen von Frostschäden bei Pflanzenblättern" (Betreuer: Prof. Dr. Krause);
Promotion:	Dr. rer. nat. am 20. Juli 1983; Thema der Inauguraldissertation: "Untersuchungen des Mechanismus der Frostschädigung von Blättern frostempfindlicher und kälteakklimatisierter Blütenpflanzen" (Betreuer: Prof. Dr. Krause. Institut für Botanik II, Universität Düsseldorf)